

**CARACTERIZACIÓN Y POTENCIALIDAD DE PRODUCCIÓN DE  
MICOTOXINAS DE ESPECIES DEL GÉNERO *Fusarium* PROCEDENTES DE  
GRANOS DE TRIGO FIDEO *Triticum durum* Desf.**

**Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae en Protección Vegetal  
de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata**

**ÉRIKA CRISTINA CASTILLO TAMAYO**  
**Ingeniera en Biotecnología – Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE)**



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

**DIRECTORA**

Gladys A. Lori  
Ing. Agrónoma (Universidad Nacional de La Plata)

**CO-DIRECTOR**

Ismael Malbrán  
Ing. Agrónomo (Universidad Nacional de La Plata)  
Dr. en Ciencias Agropecuarias

**EVALUADORES**

**María Laura Ramírez**  
Microbióloga (Universidad Nacional de Río Cuarto)  
Dra. en Ciencias Biológicas

**Sofía Noemí Chulze**  
Lic. Microbiología (Universidad Nacional de Río Cuarto)  
Dra. en Ciencias Biológicas

**Virginia Elena Fernández Pinto**  
Lic. Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)  
Dra. en Ciencias Químicas

Fecha de defensa: 28 de marzo de 2019

**A Dios**

**A mis padres Cristina y Patricio**

**A mis abuelitos Enriqueta y Miguel Ángel**

**A mis hermanos PJ, Soffy y Diani. A mi sobrinito Juanes**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores de tesis, Gladys Lori e Ismael Malbrán, por recibirme en su grupo de trabajo, por su paciencia y compromiso con esta tesis.

A Ceci por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo, a pesar de tantas dificultades encontradas en el camino. Gracias por tu cariño y amistad.

A Pauli y Marinita por brindarme su amistad y compañía en mis labores diarias.

A todos mis amigos del CIDEFI por el apoyo, su afecto y amistad, porque siempre me hicieron sentir en casa.

A ti que con tus locuras y ocurrencias alegras mis días y llenas mi corazón.

A mis padres, que con su ejemplo me inspiran a ser mejor cada día. Gracias por enseñarme a luchar por mis sueños y sobre todo por darme las herramientas para hacerlo.

A mis hermanos (PJ, Soffy y Diany) que me acompañan siempre y me dan ánimo para continuar. Les agradezco, también, porque me han regalado la oportunidad de convertirme en tía.

A Caro, Mafe, Eli, Eric, Alejandro, Moni, Mau, Solcito y Andrés (in situ) por ser mi familia en Argentina.

A Alex y Tañis (ex situ) por su complicidad y cariño.

A ti que, aunque ahora ya no estás me ayudaste a cumplir mi sueño.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Producción de trigo fideo en el mundo y en la Argentina</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Fusariosis de la espiga de trigo (FET)</b>	<b>5</b>
1.2.1. Ciclo de la enfermedad	8
1.2.2. Sintomatología y daños	9
1.2.3. Impacto de la fusariosis de la espiga en la producción mundial de trigo	12
<b>1.3. Identificación taxonómica y molecular de la micobiota asociada a la fusariosis de la espiga</b>	<b>15</b>
1.3.1. Historia de la taxonomía del género <i>Fusarium</i>	15
1.3.2. Características morfológicas y culturales del género <i>Fusarium</i>	18
1.3.3. Complejo de especies de <i>Fusarium graminearum</i>	20
1.3.4. Herramientas moleculares utilizadas en la identificación	21
<b>1.4. Micotoxicosis y producción de micotoxinas por especies del género <i>Fusarium</i></b>	<b>22</b>
1.4.1. Estructuras y propiedades de las micotoxinas producidas por especies del género <i>Fusarium</i>	24
1.4.1.1. Tricotecenos	24
1.4.1.2. Zearalenona	29
1.4.1.3. Fumonisinias	29
1.4.1.4. Moniliformina	30
1.4.2. Efecto de las micotoxinas sintetizadas por especies del género <i>Fusarium</i> sobre la salud humana y animal	31
1.4.2.1. Efectos de los tricotecenos	31
1.4.2.2. Efectos de la zearalenona	32
1.4.2.3. Efectos de las fumonisinas	32
<b>1.5. Justificación</b>	<b>33</b>
Hipótesis	35
Objetivos	35

<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
2.1. Caracterización del material biológico, identificación taxonómica y mantenimiento de los aislamientos .....	36
2.2. Identificación taxonómica mediante herramientas de biología molecular...	38
2.3. Análisis genómico de los quimiotipos de las especies de <i>Fusarium</i> vinculadas con la FET .....	41
2.4. Análisis estadístico .....	42
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
3.1. Aislamiento e identificación taxonómica .....	43
3.1.1. Análisis de resultados por localidad .....	50
3.1.2. Análisis de resultados por época de siembra .....	55
3.1.3. Efectos de la micobiota sobre la calidad de grano .....	57
3.2. Quimiotipos de las especies de <i>Fusarium</i> vinculadas con la FET .....	58
<b>4. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>63</b>
4.1. Contexto de la problemática.....	63
4.2. Conclusiones finales.....	64
4.3. Interrogantes surgidos a partir del presente estudio .....	65
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>66</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones agroclimáticas .....	36
<b>Tabla 2.</b> Precipitaciones por localidad.....	37
<b>Tabla 3.</b> Cebadores utilizados para la identificación por PCR de las especies de <i>Fusarium</i> y sus secuencias .....	40
<b>Tabla 4.</b> Secuencias de cebadores utilizados para la detección de quimiotipos .....	41
<b>Tabla 5.</b> Velocidad de crecimiento micelial según especie .....	45
<b>Tabla 6.</b> Identificación morfo-biológica de las distintas especies de <i>Fusarium</i> aisladas de muestras de trigo fideo.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Localización de la producción de trigo fideo en la Argentina. ....	4
<b>Figura 2.</b>	Ciclo de la Fusariosis de la espiga de trigo ocasionada por <i>Fusarium graminearum</i> .....	8
<b>Figura 3.</b>	Espiga de trigo con síntomas de la enfermedad .....	10
<b>Figura 4.</b>	Granos de trigo con daño visible ocasionado por la Fusariosis de la Espiga .....	11
<b>Figura 5.</b>	Relación entre los taxonomistas involucrados en el estudio del género <i>Fusarium</i> .....	16
<b>Figura 6.</b>	Esporas producidas por las especies del género <i>Fusarium</i> . (A) macroconidios de <i>F. graminearum</i> ; (B) microconidios de <i>F. solani</i> y (C) clamidosporas de <i>F. oxysporum</i> .....	19
<b>Figura 7.</b>	Morfología de la célula conidiógena (A) monofálides y (B) polifálides .....	19
<b>Figura 8.</b>	Estructura química de los tricotecenos .....	25
<b>Figura 9.</b>	Estructura química de algunos de los representantes de los cuatro grupos básicos de tricotecenos.....	26
<b>Figura 10.</b>	Estructura química de la zearalenona (ZEA).....	29
<b>Figura 11.</b>	Estructura química de la fumonisina B .....	30
<b>Figura 12.</b>	Estructura química de la moniliformina (MON) .....	30
<b>Figura 13.</b>	Identificación morfo-biométrica de aislamientos. (A) coloración de micelio aéreo; (B) coloración de medio de cultivo agar papa glucosado (APG); (C) siembra en medio de cultivo agar hoja de clavel (CLA); (D) tamaño y forma de macroconidios .....	43
<b>Figura 14.</b>	Características de las colonias de distintas especies de <i>Fusarium</i> en APG. La imagen superior de cada par muestra el micelio y la imagen inferior, la pigmentación del medio para: (A) <i>F. cerealis</i> ; (B) <i>F. graminearum</i> ; (C) <i>F. oxysporum</i> ; (D) <i>F. poae</i> ; (E) <i>F. proliferatum</i> ; (F) <i>F. pseudograminearum</i> ; (G) <i>F. semitectum</i> y (H) <i>F. subglutinans</i> .....	44
<b>Figura 15.</b>	Crecimiento de una colonia de <i>F. pseudograminearum</i> en APG a distintos tiempos de incubación. ....	45
<b>Figura 16.</b>	(A) Macroconidios de <i>F. acuminatum</i> ; (B) Clamidosporas de <i>F. poae</i> y (C) Células apical y basal de macroconidios de <i>F. graminearum</i> .....	47
<b>Figura 17.</b>	Distribución del número de aislamientos por cada especie del género <i>Fusarium</i> obtenida durante el estudio .....	47



<b>Figura 18.</b>	La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1 000 pb, la calle 1 al control negativo sin ADN, la calle 2 al control positivo de <i>F. graminearum</i> y las calles 3 – 22 a ADN de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp .....	48
<b>Figura 19.</b>	Gel de agarosa para la visualización del resultado de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de aislamientos de <i>Fusarium pseudograminearum</i> , determinada por la presencia de un fragmento de 523 pb. La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1 000 pb, la calle 1 al control negativo sin ADN, la calle 2 al control negativo ( <i>F. graminearum</i> cepa RBG 2507), la calle 3 al control positivo de <i>F. pseudograminearum</i> y las calles 4 – 20 a ADN de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp .....	49
<b>Figura 20.</b>	Gel de agarosa para la visualización del resultado de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de aislamientos de <i>Fusarium cerealis</i> , determinada por la presencia de un fragmento de 842 pb. La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1 000 pb, la calle 1 al control negativo sin ADN, la calle 2 al control negativo ( <i>F. graminearum</i> cepa RBG 2507), la calle 3 al control positivo de <i>F. cerealis</i> y las calles 4 – 10 a ADN de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp .....	49
<b>Figura 21.</b>	Frecuencia de especies de <i>Fusarium</i> encontradas en Balcarce .....	50
<b>Figura 22.</b>	Frecuencia de especies de <i>Fusarium</i> encontradas en La Dulce .....	51
<b>Figura 23.</b>	Frecuencia de especies de <i>Fusarium</i> encontradas en Miramar .....	51
<b>Figura 24.</b>	Frecuencia de especies de <i>Fusarium</i> encontradas en Cabildo .....	51
<b>Figura 25.</b>	Contaje de especies de <i>Fusarium</i> encontradas en las localidades de estudio .....	52
<b>Figura 26.</b>	Interacciones entre especies de <i>Fusarium</i> y las localidades de estudio .....	53
<b>Figura 27.</b>	Ubicación geográfica de las localidades de la Provincia de Buenos Aires donde se produce trigo fideo .....	54
<b>Figura 28.</b>	Número de aislamientos de <i>Fusarium</i> encontrados en las distintas épocas de siembra. (A) Primera época y (B) Segunda época .....	56
<b>Figura 29.</b>	Evaluación de la germinación de semillas de trigo fideo a los 7 d. (A) Balcarce y (B) Cabildo .....	58
<b>Figura 30.</b>	Poder germinativo por localidad. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) .....	58
<b>Figura 31.</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de los quimiotipos (Starkey <i>et al.</i> , 2007). La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1 000 pb., la calle 1 al control negativo (sin ADN), la calle 2 al control positivo 15-ADON ( <i>F. graminearum</i> aislamiento RBG 2507), la calle 3 al control positivo NIV ( <i>F. cerealis</i> aislamiento MR34) y de las calles 4 – 20 a muestras de ADN de aislamientos fúngicos de <i>Fusarium</i> spp. Tamaño de los fragmentos 840 pb: NIV, 670 pb: 15-ADON y 410 pb: 3-ADON .....	59
<b>Figura 32.</b>	Caracterización de quimiotipos de los aislamientos identificados como <i>Fusarium</i> spp. por localidad .....	60

## ABREVIATURAS

15-ADON	15-acetil deoxinivalenol
3-ADON	3-acetil deoxinivalenol
ADN	ácido desoxirribonucleico
ANOVA	análisis de la varianza
APG	medio de cultivo agar papa glucosado
ATA	leucopenia tóxica alimentaria (Alimentary Toxic Aleukia)
AHC	agar hoja clavel (carnation leaf agar)
Cfa	clima templado humedad subtropical (Clasificación de climática de Köppen)
Cfb	clima templado humedad oceánica (Clasificación de climática de Köppen)
d	día/días
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
DON	desoxinivalenol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FET	Fusariosis de la Espiga de Trigo; <i>Fusarium</i> head blight FHB
HR	humedad relativa
NIV	nivalenol
PCNB	pentacloronitrobenceno
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
ppm	partes por millón
RNAsa	ribonucleasa
ZEA	zearalenona

## RESUMEN

El cultivo de trigo fideo (*Triticum durum* Desf.) está expuesto al ataque de enfermedades que provocan la disminución del rendimiento, la pérdida de calidad y la contaminación del grano con micotoxinas, un factor de riesgo muy importante que compromete su utilización en la alimentación, tanto humana como animal. La “fusariosis de la espiga de trigo” (FET), ocasionada por *Fusarium graminearum* Schwabe, es una de las enfermedades que afecta considerablemente a la producción de trigo fideo en la Argentina. Los metabolitos de mayor importancia por su patogenicidad son los tricotecenos, principalmente el deoxinivalenol (DON). En el presente trabajo, se determinaron las características morfo-fisiológicas y moleculares de 169 aislamientos obtenidos del género *Fusarium* y se identificaron 161 aislamientos: *F. acuminatum* (1), *F. cerealis* (6), *F. graminearum* (68), *F. oxysporum* (8), *F. poae* (9), *F. proliferatum* (1), *F. pseudograminearum* (16), *F. semitectum* (51) y *F. subglutinans* (1). Se encontró la presencia mayoritaria de *F. graminearum sensu stricto* (68), considerado como el principal agente causal de la FET en la Argentina, además de otras especies de interés, como *F. cerealis* (6) y *F. pseudograminearum* (16). La predominancia de *F. graminearum* (68) en las localidades del sudeste (Balcarce, La Dulce y Miramar); y, la de *F. semitectum* (51) en la localidad del sudoeste (Cabildo) evidenciaría el efecto de las distintas condiciones agroclimáticas existentes en las áreas estudiadas sobre la microbiota asociada a la FET. Las semillas procedentes de Cabildo mostraron el mejor porcentaje de germinación (93%), en relación con las procedentes de las otras tres localidades, en las cuales el porcentaje de germinación fue menor al 80%. El quimiotipo 15-ADON fue obtenido con mayor frecuencia, resultado directamente relacionado con la presencia de *F. graminearum*, especie predominante en el presente estudio.

**Palabras claves:** FET, trigo fideo (*Triticum durum*), *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. cerealis*, condiciones agroclimáticas.

## ABSTRACT

The durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cropping is exposed to the attack of diseases that cause the decrease of yield, loss of quality and contamination of the grain with mycotoxins, a very important risk factor that compromises its use in food, both human and animal. The "Fusarium head blight" (FHB), caused by *Fusarium graminearum* Schwabe, is one of the diseases that affects considerably the production of wheat in Argentina. The most important pathogenic metabolites are trichothecenes, mainly deoxynivalenol (DON). In the present work, the morpho-physiological and molecular characteristics of 169 isolates obtained from the *Fusarium* were determined and 161 isolates were identified: *F. acuminatum* (1), *F. cerealis* (6), *F. graminearum* (68), *F. oxysporum* (8), *F. poae* (9), *F. proliferatum* (1), *F. pseudograminearum* (16), *F. semitectum* (51) and *F. subglutinans* (1). The majority presence of *F. graminearum sensu stricto* (68) was found, considered the main causative agent of FHB in Argentina, as well as other species of interest, such as *F. cerealis* (6) and *F. pseudograminearum* (16). The predominance of *F. graminearum* (68) in the southeastern towns (Balcarce, La Dulce and Miramar); and, that of *F. semitectum* (51) in the southwestern locality (Cabildo) would show the effect of the different agroclimatic conditions existing in the studied areas on the mycobiota associated with the FHB. The seeds from Cabildo showed the best percentage of germination (93%), in relation to those from the other three locations, in which the percentage of germination was less than 80%. The 15-ADON chemotype was obtained more frequently, a result directly related to the presence of *F. graminearum*, the predominant species in the present study.

**Key words:** FHB, durum wheat (*Triticum durum*), *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. cerealis*, agroclimatic conditions.

# 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1. Producción de trigo en el mundo y en la Argentina

En la región comprendida entre los ríos Tigris y Éufrates, alrededor de los años 10.000-15.000 a.C., se comenzó a domesticar el trigo. Dicha acción dio lugar a los primeros asentamientos de grupos humanos y determinó una etapa de la evolución del *Homo sapiens*, que pasó así de la fase de cazador-recolector a la de agricultor (Bozzini, 1988). Las evidencias más antiguas sobre el cultivo del trigo provienen de Siria, Iraq, Turquía y Jordania (Juárez *et al.*, 2014).

La primera clasificación de las especies de trigo (*Triticum* spp.), que fue propuesta por Carl von Linneo en 1753, se basó en diferencias biométricas y morfológicas que le permitieron establecer cinco especies: *T. aestivum*, *T. hybernum*, *T. turgidum*, *T. spelta* y *T. monococcum* (Gowayed, 2009). Una clasificación posterior, que surgió a partir de los trabajos citogenéticos de Sakamura, hizo referencia al número cromosómico de cada tipo morfológico. Según esto, las especies de trigo pueden clasificarse en 3 grupos básicos: diploides (14 cromosomas), tetraploides (28 cromosomas) y hexaploides (42 cromosomas) (Rubianes, 2007). En la actualidad, la clasificación más aceptada es la propuesta por Mac Key, que respeta las reglas de la nomenclatura botánica, así como la importancia que tienen los criterios morfológicos, fisiológicos, citológicos, genéticos, bioquímicos y evolutivos (Rubianes, 2007).

El trigo fideo (*T. turgidum* L. (Thell) *durum*), identificado tradicionalmente como *T. durum* Desf., también conocido como trigo candéal, fideo, moruno, siciliano, semolero o fanfarrón, es una especie botánica autógama y tetraploide AABB (Bennici, 1986). Se caracteriza por poseer granos "desnudos", en comparación con otras especies en las cuales las glumas son duras, difíciles de eliminar y permanecen unidas al grano (Bennici, 1986; Rubianes, 2007). Su grano es normalmente grande, dorado, translúcido y posee el endosperma más duro entre los trigos (Molfese y Seghezze, 2012). Tiene un elevado valor nutritivo, ya que el índice de gluten es alto y el contenido de proteína es de 12 a 14% (Aguilar, 2013).

El producto final de trigo fideo más difundido, particularmente en Europa y países norteamericanos, es la pasta en sus diferentes formas (vermicelli, spaghetti, noodles y

macaroni) (Molfese y Seghezzo, 2012; Juárez *et al.*, 2014); mientras que, en otras áreas, como Oriente Medio y el norte de África, también es empleado en la elaboración de couscous y de pan (Palumbo *et al.*, 2000; Rubianes, 2007; Lionetti *et al.*, 2015).

La historia, tradición y requerimientos de calidad industrial hacen de esta especie el trigo más adecuado para la fabricación de fideos. Las pastas elaboradas con este trigo son superiores tanto en apariencia como en calidad de cocción, en comparación con aquellas hechas con trigo pan. Esto se debe a un mejor comportamiento en la molienda, a la calidad del gluten (elasticidad y adhesión), al rendimiento en fideo, al color de la sémola (contenido de pigmento amarillo) y a la granulometría (Irvine, 1978; Seghezzo y Molfese, 1999).

De la producción mundial de trigo, apenas entre el 5% y el 8% corresponde a la producción de trigo fideo (Aguilar, 2013). En 2011, por ejemplo, la producción mundial de este cereal fue de 36,7 Mt por debajo de la demanda que se estimó en 37,3 Mt (Jara, 2011). En 2014 se produjeron entre 35 y 40 Mt de trigo fideo (Seghezzo, 2014), mientras que en años anteriores se observó una tendencia oscilante. Según datos proporcionados por el Consejo Internacional de Cereales, ya en el 2006 se observó una reducción de 6,5% en la producción del trigo fideo (34,8 Mt) con respecto a la del año 2005. Uno de los factores que contribuyó fue la drástica disminución del área de cultivo en 8%, en comparación con la disminución ocurrida entre el 2002 y el 2005, que en promedio fue de 6,1% (Sgroi y Fazio, 2007).

En 2017, la producción mundial de trigo fue de 757 Mt. El incremento con respecto a 2016 se debió principalmente a la mayor producción del cereal en la Federación Rusa, que compensó la baja en la producción de Canadá y de Estados Unidos, donde la sequía afectó negativamente al rendimiento. (FAO, 2017).

Para 2018, la FAO estima que la producción mundial alcance las 750 Mt de trigo. Para EE. UU, espera que la superficie sembrada aumente; en la Federación Rusa se pronostica la ocurrencia de condiciones atmosféricas favorables. En la UE se prevé que la producción de invierno disminuya por la reducción de la superficie sembrada, mientras que en Asia la producción de China e India, los mayores países productores de trigo, se espera que se reduzca ligeramente respecto de los niveles sin precedentes de

2017. Sin embargo, la producción mundial podría quedar por debajo de los niveles alcanzados en 2017 (FAO, 2018).

Dentro de la UE, Italia es el país que registra el mayor consumo de pastas per cápita ( $26 \text{ kg hab}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) (Lezcano, 2009; Jara, 2011; Seghezzo, 2014). En Estados Unidos, por su parte, el incremento del consumo de este trigo durante la primera década del siglo XXI fue notable (2,3%), siendo las razones que han motivado este cambio la fácil preparación de las pastas, el cambio de estilo de vida hacia una alimentación saludable y la popularidad de los restaurantes italianos (Jara, 2011).

En la Argentina, de acuerdo con cifras de la Unión Industrial de la Pasta Italiana (UNIPi), el consumo anual de pastas per cápita fue de 7,2 kg en 2008 (Lezcano, 2009) y en 2012 se incrementó hasta alcanzar los 7,9 kg (Lezcano, 2013; 2014). Se prevé que en los próximos años el consumo de pastas en el país podría duplicarse, ya que la población está en la búsqueda de alternativas alimenticias saludables y nutritivas, de fácil cocción y de precio accesible (Seghezzo, 2014). Desde 2010, de manera permanente se muelen más de 200 kt de este cereal (Lezcano, 2013; 2014).

La primera siembra de trigo fideo en la Argentina data de 1914 cuando el agricultor Emilio Vassolo, con la finalidad de mejorar la calidad de sus cultivos, utilizó 2 kg de excelente trigo (llamado "Sarabola") que provenían de Campobasso, Italia, su lugar de origen. Después de varios años de siembras, al obtener una cantidad suficiente de granos, se realizó la primera siembra de trigo fideo a gran escala en la localidad de Tres Arroyos (Ruiz Moreno, s.f.). Sin embargo, fue en la campaña 1963/64 cuando se registraron, de manera oficial, las primeras cifras de producción (Seghezzo, 2014).

En la campaña 1969/70, la producción fue de 760 kt (419.700 ha sembradas), con lo que la Argentina alcanzó el 3° lugar como país exportador. El promedio de la superficie sembrada entre las campañas 2009 y 2014 fue de 57.000 ha y la producción aproximada fue de  $144.000 \text{ t año}^{-1}$  (Seghezzo, 2014).

En la Argentina, la producción de trigo fideo se localiza principalmente en el Sudeste y Sudoeste de la Provincia de Buenos Aires (subregión triguera IV y parte de la V Sud) (Figura 1).



**Figura 1.** Localización de la producción de trigo fideo en la Argentina. Tomado de Seghezzo, 2014.

En la campaña 2012/13 se cultivaron 41.456 ha, de las cuales se cosecharon 40.196 ha con un rendimiento promedio de 2.670 kg ha<sup>-1</sup>, que resultó en un volumen de producción de 107.314 t (Informe Institucional sobre la Calidad del Trigo Argentino, 2013).

La mayor parte de trigo fideo producido en la Argentina es cultivado a través de contratos entre el productor y la industria, que es muy exigente en los requerimientos de calidad del grano, los cuales son empleados para la fijación del grado y el precio en la comercialización (Molfese y Seghezzo, 2012). En este sentido, resulta de fundamental importancia el efecto que las enfermedades, que afectan al cultivo, puedan tener sobre el rendimiento y la calidad del grano producido.

En Ecuador, el trigo, el arroz, la cebada y el maíz han sido tradicionalmente los cereales de mayor consumo (Holguín y Alvarado, 2017). La producción nacional de trigo (mayoritariamente *T. aestivum*) decayó de 78.770 t en 1961 a 8.533 t en 2010, como consecuencia de la importación de trigo subsidiado desde EE. UU. Las directrices sobre la comercialización de este cereal se modificaron y perjudicaron a la producción nacional, que dejó de ser competitiva y provocó pérdidas al sector campesino (INEC, 2014).



En la última década el consumo per cápita de trigo en Ecuador ha sido superior a 30 kg año<sup>-1</sup> (Garófalo *et al.*, 2011; Pullas, 2017). La producción en 2016 llegó a 6.746 t (4.619 ha sembradas, 4.423 ha cosechadas), que equivalen al 0,5% de la demanda nacional, por lo que se importaron alrededor de 936 kt de trigo en grano, procedentes de Canadá (54%), Estados Unidos (30%), Argentina, Brasil, Ucrania y Rusia. En ese año Ecuador exportó 177 t de harina, 769 t de pastas alimenticias y 2.703 t de pan y galletas; principalmente a Perú (52%) y a Estados Unidos (28%). Las pérdidas sufridas en la producción estuvieron relacionadas con sequías (59%), ataques de plagas y enfermedades (33%), heladas (4%) y con otros factores (4%) (Gaethe, 2017).

Actualmente, el Instituto de Investigación Agropecuaria del Ecuador (INIAP) y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGAP) promueven el incremento de las áreas sembradas con trigo en las provincias de la Sierra por lo que se prevé que el área sembrada aumente hasta al menos 69.000 ha para el 2023 (Holguín y Alvarado, 2017).

En las provincias de Chimborazo, Bolívar, Pichincha e Imbabura se encuentra la mayor área de cultivos de trigo. De acuerdo con el nivel de precipitaciones, la siembra inicia en diciembre en las provincias de la Sierra norte o en enero hasta marzo en las provincias de la Sierra centro. El ciclo de los cultivares utilizados tiene una duración entre 170-190 d hasta llegar a su madurez fisiológica. La cosecha empieza en julio y se puede extender hasta septiembre (Gaethe, 2017).

## **1.2. Fusariosis de la espiga de trigo (FET)**

La Fusariosis de la espiga de trigo (FET) es una enfermedad fúngica importante que afecta a varias gramíneas, entre ellas al trigo fideo. Los primeros síntomas se presentan después de la floración, en las espigas enfermas se aprecia un desecamiento prematuro de alguna de las espiguillas o de la espiga completa (Schmale y Bergstrom, 2003).

La FET o golpe blanco (de Galich, 1997) fue descrita por primera vez en Inglaterra en 1884. En el siglo XIX, fue considerada como un problema serio en Europa y, a partir de 1890, fue ampliamente reportada en los Estados Unidos. En el inicio del siglo XX, fue considerada un grave peligro para los cultivos de trigo y cebada (Kohli *et al.*, 1995; Stack, 2000).

A partir de 1995 se consideró a la FET como una enfermedad de importancia en las regiones cálido-húmedas del mundo, así como en el norte-centro de Europa, Asia, principalmente en China y Japón, donde la enfermedad es endémica. Esta patología también se encuentra presente en la zona costera del norte de África, norte de Estados Unidos, sur de Canadá, altiplanos de México y en América del Sur, principalmente en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (Saari y Wilcoxon, 1974; Kohli, 1989; Ireta y Gilchrist, 1994; Kohli *et al.*, 1995).

La FET es responsable de pérdidas económicas directas, pues ocasiona la reducción del rendimiento y calidad (granos abortados o arrugados, decolorados y pérdida de peso). Provoca a su vez pérdidas indirectas debido a la contaminación de los granos con micotoxinas, lo que frecuentemente genera su rechazo o descalificación durante el proceso de comercialización (Sutton, 1982; Snijders, 1990; Gilbert y Tekauz, 2000; Osborne y Stein, 2007; McMullen *et al.*, 2012).

De acuerdo con Stack (2003), el desarrollo del estudio de la FET se produjo en cuatro etapas claramente identificadas. La primera etapa (desde 1880 hasta la primera década del siglo XX) se caracterizó por los reportes iniciales de la enfermedad y la identificación de los agentes causales. En la segunda etapa (desde 1908), se logró reproducir la enfermedad mediante su inoculación artificial y se caracterizó por los estudios experimentales sobre la etiología, patogenicidad y susceptibilidad de los hospedantes a la FET. En la tercera etapa, también conocida como “era oscura” (desde 1950 hasta 1970), Snyder y Hansen (1940; 1941; 1945; 1954) impulsaron la reconfiguración de la taxonomía del género *Fusarium* al agrupar un número importante de especies, incluida *F. graminearum*, en una única especie *F. roseum*. Esto dificultó la investigación de la FET debido a que los resultados que se obtuvieron durante ese período fueron difíciles de evaluar e interpretar con posterioridad.

Finalmente, alrededor de 1980 se inició la cuarta etapa o “era moderna”, en la que se lograron mayores niveles de detalle en la identificación taxonómica de las especies involucradas (Nelson *et al.*, 1983); en la comprensión de la acción de los agentes fúngicos, asociada a la producción de micotoxinas; y en el empleo de métodos analíticos para su detección.

En los casi 130 años transcurridos desde los primeros reportes de la enfermedad, en la mayor parte de las regiones productoras de trigo al menos 17 especies dentro del género *Fusarium* han sido asociadas con la ocurrencia de ataques de FET (Parry *et al.*, 1995). En una investigación realizada en 21 provincias y ciudades chinas, desde 1976 a 1980, se aislaron e identificaron a partir de muestras de granos enfermos 18 especies del género *Fusarium*. Al evaluar la capacidad patógena de las distintas especies sobre cultivos de trigo, los aislamientos se clasificaron según sus niveles de agresividad (en alta, moderada y baja) (Liu, 1985; Kohli *et al.*, 1995).

Como los principales agentes causales de la enfermedad se mencionan a *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* y *F. poae* (Miller *et al.*, 1988, citado por Kohli *et al.*, 1995; Mihuta-Grimm y Foster, 1989; Kikot, 2012; Wegulo *et al.*, 2013). Hasta hace algunos años, *F. culmorum* era considerado como el agente causal más común en las regiones templadas y frías de Europa (Snijders, 1989; Gilchrist y Dubin, 2002); mientras que en Asia, América del Norte, América del Sur y parte de Europa predominaba *F. graminearum* (Kohli *et al.*, 1995; Kikot, 2012).

En la Argentina, *F. graminearum sensu stricto* (Schwabe), es la especie más frecuentemente relacionada con la enfermedad (Kikot *et al.*, 2011; Kikot, 2012). Sin embargo, a partir de granos infectados se han aislado otras especies menos patogénicas de *Fusarium*, entre las que se pueden citar *F. equiseti*, *F. poae*, *F. semitectum*, *F. cerealis* y *F. acuminatum*. Estas normalmente están presentes en las campañas en las que las condiciones climáticas no favorecen la aparición del principal agente causal (de Galich 1997; Malbrán, 2013).

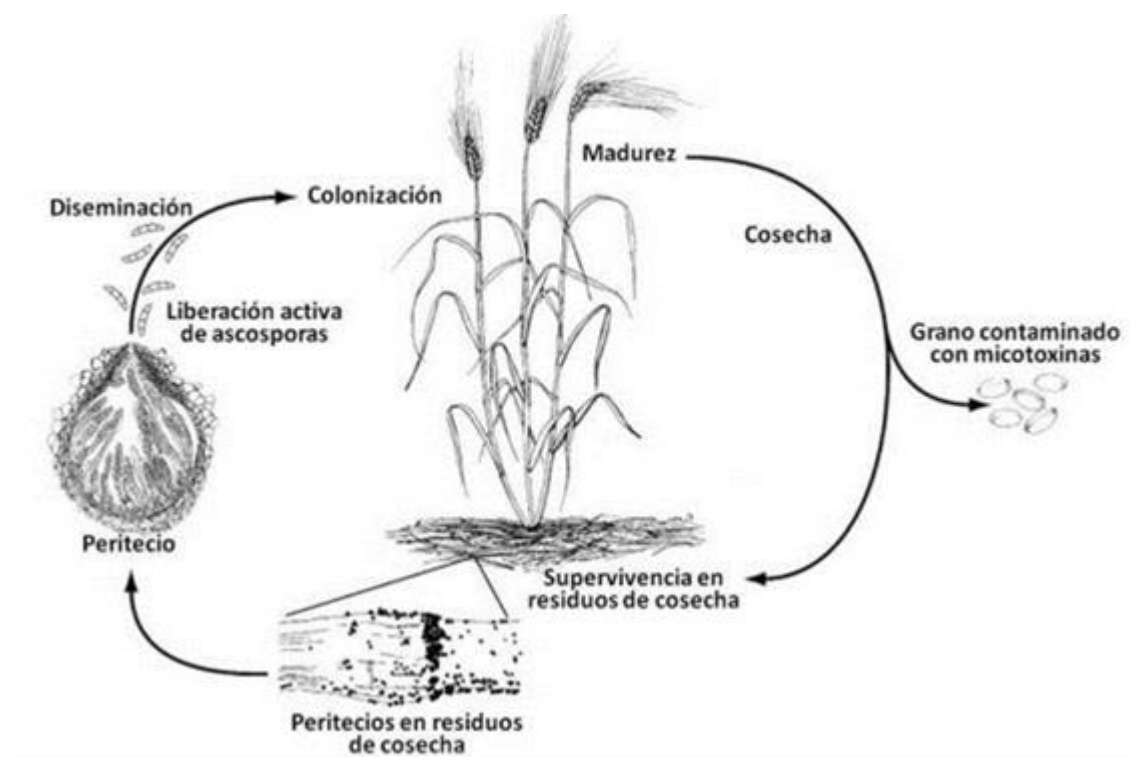
La frecuencia de epidemias de la FET se incrementó en los últimos años del Siglo XX y los primeros del XXI, especialmente en la Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Estados Unidos, Canadá, países del centro-este de Europa, China y Japón (Ireta y Gilchrist, 1994; de Galich, 2002).

En la Argentina, en el año 1927, se observó por primera vez la presencia de *F. graminearum* sobre trigo. En la década siguiente se observaron síntomas típicos de la fusariosis; y recién 15 años después, esta llegó a ser una enfermedad ampliamente distribuida. Fue en 1963 cuando el patógeno se consideró como una limitante grave para

la producción de trigos harineros en el área centro-norte y para los trigos fideo en el sureste de la región triguera argentina (Kohli *et al.*, 1995).

### **1.2.1. Ciclo de la enfermedad**

El proceso infectivo de la FET se inicia cuando las ascosporas de *F. graminearum* (inóculo primario) son liberadas en presencia de alta humedad relativa y depositadas por el viento en las anteras expuestas de la espiga del trigo (Figura 2). La fuente de inóculo primario para la enfermedad la constituyen los residuos de cosecha, en los que el patógeno sobrevive saprofiticamente en estado sexual. En la primavera, el clima templado-cálido y húmedo favorece el desarrollo y maduración de los peritecios, que contienen las ascas con las ascosporas, en forma concurrente con el momento de la floración de los cereales (Goswami y Kistler, 2004). Las ascosporas son liberadas en forma activa desde los peritecios maduros formados en la superficie del rastrojo y son dispersadas por el viento, la lluvia o los insectos, hacia los hospedantes (Gordon 1959; Parry *et al.*, 1995).



**Figura 2.** Ciclo de la Fusariosis de la Espiga de Trigo ocasionada por *Fusarium graminearum* Schwabe. Adaptado de Trail (2009).

El patógeno no ingresa en forma directa a través de la epidermis si no que utiliza las anteras expuestas de la flor, por lo que la susceptibilidad a la FET es mayor durante la

antes de la antesis (Schroeder y Christensen, 1963). También se cita a los estomas en las glumas, las grietas entre la lemma y la palea y las bases de las glumas como sitios de ingreso (Bushnell *et al.*, 2003; Goswami y Kistler, 2004). Las anteras, estigmas y lodículas son los órganos de la flor más fácilmente colonizables por el patógeno (Bushnell *et al.*, 2003). La presencia de las ascosporas de *F. graminearum* durante la etapa de floración del trigo asegura la infección, siempre que haya condiciones climáticas predisponentes (Lori *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 1998).

Al inicio de la infección, el crecimiento del hongo es intercelular y asintomático; después, para dispersarse radialmente en forma intracelular, utiliza los espacios intercelulares y así coloniza los tejidos de manera rápida. En la espiga el patógeno se expande a partir de los conductos vasculares que conectan las espiguillas, mientras que dentro de estas la vía de expansión la constituyen los conductos vasculares que conectan las flores. La colonización se ve favorecida cuando hay periodos prolongados de humedad lo que podría causar el crecimiento de *F. graminearum* incluso en la superficie de las glumas y glumelas (Sutton, 1982). La zona infectada se deseca tempranamente lo que ocasiona el síntoma de tizón típico de la FET y puede afectar a varias espiguillas (Bushnell *et al.*, 2003).

En condiciones ambientales favorables, el patógeno también puede producir esporas asexuales (conidios) en la superficie de los tejidos infectados. Estos se agrupan en esporodoquios, también denominados pionnotes, masas de consistencia pegajosa y de coloraciones anaranjadas (Trail, 2009).

En el caso de *F. graminearum*, cumple la mayor parte de su ciclo como un organismo haploide. Su desarrollo sexual ocurre usualmente en los restos de cosecha, donde se forman los peritecios (Malbrán, 2013), que son estructuras ostioladas de coloración azul a negra (Parry *et al.*, 1995), desde las cuales las ascosporas son liberadas en forma activa al aire. Estas esporas constituirán el inóculo primario para el desarrollo de la enfermedad durante la estación de cultivo siguiente (Malbrán, 2013).

### **1.2.2. Sintomatología y daños**

Generalmente, en el centro de la espiga se ubican las primeras flores que alcanzan la antesis y en ellas se pueden visualizar los primeros síntomas de la infección. Entre la base y la mitad de las glumas o en el raquis se observa la sintomatología inicial, que se

muestra como pequeñas manchas acuosas de color marrón (Bushnell *et al.*, 2003). Según la enfermedad avanza, la coloración desaparece, pero el ataque continúa hacia toda la espiga (Figura 3).

La porción apical de la espiga, localizada sobre una espiguilla infectada, puede secarse y adquirir el color de las espigas maduras. En casos extremos, pueden apreciarse hifas del patógeno, que presentan manchas de color salmón a rosado, en los bordes de las glumas o en la base de las espiguillas infectadas; es frecuente la necrosis del raquis de las espigas (Parry *et al.*, 1995).

En la superficie de las espigas infectadas, en condiciones de alta humedad relativa, pueden observarse masas mucilaginosas de coloraciones anaranjadas a salmón que contienen las esporas asexuales (macroconidios), estos son los esporodoquios (Trail, 2009). Andersen (citado por Sutton, 1982) encontró que los macroconidios son producidos entre temperaturas de 16 y 36°C, con un valor óptimo de 32°C. Bajo condiciones cálido-húmedas, Tschanz *et al.* (1976) observaron que los peritecios se producían en un rango de 16 a 31°C; sin embargo, establecieron que a 29°C la producción se incrementaba, por lo que se considera que esa es la temperatura óptima. Mientras que la producción de ascosporas ocurre entre 13 y 33°C, con temperaturas óptimas de entre 25 y 28°C (Sutton, 1982).



**Figura 3.** Espiga de trigo con síntomas de la enfermedad.

El factor ambiental es el principal condicionante para el desarrollo de la FET. Para que la infección resulte exitosa es necesaria la ocurrencia de períodos de tiempo templado-cálido y húmedo alrededor de la antesis del cultivo. En la Argentina, mediante el desarrollo de modelos predictivos de la enfermedad, se encontró que la variable ambiental con mayor influencia en la ocurrencia de epifitias de FET es la duración de períodos de humedad relativa mayor a 90% (Moschini y Fortugno, 1996; Moschini *et al.*, 2001). Cuando esta condición se da en simultáneo con temperaturas de entre 15 y 30°C la germinación de las ascosporas se vería favorecida. Esto se demostró en un estudio realizado en China, en el que se logró un porcentaje de germinación de 97,5%, luego de 8 h a 25°C y 100% de humedad relativa (Lu *et al.*, 2001).

En un ambiente de humedad relativa elevada y de temperatura templada, el patógeno, al ingresar al grano en formación, ocasiona abortos en las flores (McMullen *et al.*, 1997). Bushnell *et al.* (2003) indicaron que en los granos en desarrollo la infección produce manchas color marrón oscuro, que se diseminan por la superficie del grano maduro, dando la impresión de un grano decolorado (Figura 4).

Los granos infectados pueden mostrarse parcial o completamente cubiertos por micelio de coloración rosada o blanca, lo cual reduce el rendimiento y la calidad del cultivo (Trigo-Stockli *et al.*, 1998), debido al descenso del peso hectolítrico (PH) y del contenido proteico del grano. Paralelamente, baja la calidad de las harinas y de los subproductos, lo que disminuye su valor comercial (Goswami y Kistler, 2004).



**Figura 4.** Granos de trigo con daño visible ocasionado por la Fusariosis de la Espiga.

Otro efecto negativo sobre los granos es la contaminación con micotoxinas producidas por el patógeno, como el deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) y zearalenona (ZEA) (Lori *et al.*, 1992; 2003; Dalcero *et al.*, 1997; Rizzo *et al.*, 1997; González *et al.*, 2008). La presencia de estos metabolitos secundarios compromete la utilización del grano en la alimentación, constituyéndose en un riesgo para la salud humana y animal.

### **1.2.3. Impacto de la fusariosis de la espiga en la producción mundial de trigo**

En varios países de Europa, del hemisferio Sur, del hemisferio norte y de Asia, la FET es considerada como una de las enfermedades fúngicas de mayor importancia para el cultivo del trigo (Kohli, 2013).

En Asia, China, el mayor productor de trigo a nivel mundial, es uno de los países más afectados por la enfermedad, que es considerada endémica (McMullen *et al.*, 1997). En el período de 28 años que va desde 1957 a 1984 se registraron 4 epidemias severas y 15 moderadas en el país (Liu, 1985). En los años de epidemias severas, la tasa de espigas infectadas superó el 50%; mientras que la pérdida de rendimiento varió de 10 a 40%. Se estima que la enfermedad afectó un área de 6,7 Mha. Otro país afectado seriamente ha sido Corea del Sur, donde en 1963 la alimentación de parte de la población se vio comprometida por los severos daños ocasionados por la fusariosis (McMullen *et al.*, 1997).

En Europa, se registraron pérdidas de rendimiento por fusariosis de alrededor del 30% en Alemania durante 1980 y 1981 (Meyer *et al.*, 1985). En los Países Bajos, por su parte, en el periodo comprendido entre 1979 y 1985 la prevalencia de la FET fue superior al 66%, con una la severidad media de alrededor del 2%. Otros países en los que también se han reportado epidemias fueron Polonia, el Reino Unido, las Repúblicas Checoslovacas, Rusia y Austria (Snijders, 1989).

En América del Norte, Arthur reportó la primera epidemia de fusariosis en Estados Unidos en 1890 en Indiana; con incidencias que fluctuaron entre 25 y 75% (Kohli *et al.*, 1995). McMullen *et al.* (1997) indicaron que en 1982 se observaron pérdidas de 2,72 Mt de trigo, que correspondían al 4% del total de la producción de Estados Unidos. En el este de Kansas se registraron epidemias en 1993 y en 1995, esta última fue considerada como una de las epidemias más severas desde la década de 1970 (Dill-Macky, 1997). Se



observaron pérdidas estimadas en 3 mil millones de dólares debido a epidemias sucesivas, que obligaron a varios productores a salir del mercado competitivo (Díaz de Ackermann *et al.*, 2007). En Canadá, en 1980, una gran epidemia provocó pérdidas de rendimiento de entre el 30 y el 70% en los trigos primaverales de las provincias atlánticas (Martin y Johnston, 1982). Según Sutton (1982) entre los años 1927 y 1980 en el sudoeste de Ontario se produjo una epidemia moderada de FET cada cuatro años. En México, la FET se observó en 1977 en el área del Altiplano de Jalisco, aunque en su momento no se identificó al agente causal. En 1986, se restringió la enfermedad a las zonas de cultivo de trigo en los estados de Jalisco, Michoacán, México, Tlaxcala, Hidalgo y en la zona del Bajío en Guanajuato, con una superficie aproximada de 170.000 ha. En los años siguientes, el daño ocasionado por la fusariosis tuvo un incremento, lo que podría deberse a que el área destinada para la siembra de cereales aumentó, así como la rotación estrecha con maíz, trigo o cebada. En estas zonas las incidencias fueron de hasta el 60%; mientras que los niveles de severidad llegaron al 15%. Se observó, además, que las pérdidas de producción nacional evaluadas sobre las variedades susceptibles llegaron a ser de hasta 17%. Los trigos (pan y fideo) y triticales mexicanos afectados por la FET mostraron la presencia de *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. nivale* (= *Microdochium nivale*) y *F. equiseti* (Ireta y Gilchrist, 1994).

En América del Sur, además de en la Argentina, epidemias de FET han sido reportadas en Uruguay, Brasil y Paraguay (Alconada y Chulze, 2013). La primera epidemia severa en Uruguay se produjo en 1977, cuando un complejo de enfermedades redujo la producción nacional de trigo en casi el 50%. Los niveles de infección en las epifitias de 1985, 1990 y 1993 fueron de 40, 53 y 40%, respectivamente (Díaz de Ackermann y Kohli, 1997). En un comienzo, la estadística estimaba que en 1 de cada 16 años aparecería una epifitia de FET. Con el tiempo, las epifitias se hicieron más frecuentes llegando en principio a ocurrir en 1 de cada 11 años en promedio hasta que, en un estudio que recogió información de los 86 años entre 1915 a 2001 se identificó la probabilidad de ocurrencia de epifitias en 1 de cada 8 años (Berger *et al.*, 2011).

En Paraguay, en los años 1972 y 1975 las condiciones climáticas favorecieron a la fusariosis y a la septoriosis y la acción en conjunto de estas enfermedades causó pérdidas de hasta el 70% (Viedma, 1989).

En Brasil, Costa-Neto (1947) señaló que la primera epifitía de la fusariosis se produjo en el Estado de Rio Grande do Sul en 1939. En esta región, la enfermedad alcanzó niveles alarmantes en el período 1957-58 (Luzzardi y Pieroborn, 1989). Con base en 6 años de investigaciones, Reis determinó que en esta región la pérdida de rendimiento de grano de trigo llegó a 14% (Kohli *et al.*, 1995).

Si bien en la Argentina la enfermedad está presente desde la década de 1920; su expansión en la región triguera fue en la campaña 1945/6 (de Galich 1997). Durante esta campaña se observaron pérdidas de rendimiento del 20% en el norte de Buenos Aires y sur de Santa Fe y en 1978 de 30% en las mismas regiones (Annone *et al.*, 1994). Cerca de 20 epidemias de la FET fueron registradas en los últimos 50 años del siglo XX. En la zona de producción de trigo fideo epidemias graves tuvieron lugar en 1963, 1976, 1978 y 1985, con pérdidas de hasta el 70% de la producción. En 1976, el trigo fideo representaba el 20% de la producción de la zona triguera. Sin embargo, la epidemia de ese año fue tan grave que la producción del 60% de los lotes cayó por debajo de los estándares establecidos (de Galich, 1997). Como consecuencia de este y otros factores, el área de siembra de este cereal se redujo fuertemente. En 1985, la proporción de trigo fideo se redujo a 3,5% y fue desplazado por la producción de trigo pan que es más resistente a la enfermedad. Posteriormente la producción de trigo fideo fue inferior a la demanda del mercado interno, por lo tanto, tuvo que ser importado (de Galich, 1996). La epidemia de 1993 provocó pérdidas que, en promedio, estuvieron en el orden del 20% de la producción (Kohli *et al.*, 1995).

En la Argentina, en la campaña triguera 2012/13 se observaron problemas en los lotes por excesos hídricos. Las tormentas en la región fueron abundantes y frecuentes, por lo que el volumen de lluvia registrado alcanzó valores superiores a los históricos. Como consecuencia, el ambiente resultó favorable para el desarrollo tanto de enfermedades foliares (mancha amarilla, roya y septoriosis) como de la FET, que tuvo un alcance generalizado (Informe especial sobre cultivos – Guía Estratégica para el Agro, 2012). Los cultivos se vieron afectados tanto en el rendimiento como en la calidad del grano. Los rendimientos finales se encontraron por debajo de los 30 qq/ha, cantidad lejana a los rindes que se consiguieron el año anterior. Mientras que los granos reportaron pesos hectolítricos por debajo de la base y se observaron granos “chuzos” (Seguimiento semanal de cultivos Zona Núcleo – Guía Estratégica para el Agro, 2012).

### **1.3. Identificación taxonómica y molecular de las especies de *Fusarium* asociada a la fusariosis de la espiga y su efecto sobre la germinación de la semilla**

#### **1.3.1. Historia de la taxonomía del género *Fusarium***

El género *Fusarium* fue descrito y nombrado por primera vez por Link. Su investigación se basó en la forma distintiva de los conidios fusiformes (Leslie y Summerell, 2006; Refai *et al.*, 2015). Sin embargo, según Seifert la producción de estos macroconidios distintivos no es necesariamente la única característica de *Fusarium*, ya que varios coelomycetes producen esporas similares a las de algunas especies de este género (Leslie y Summerell 2006).

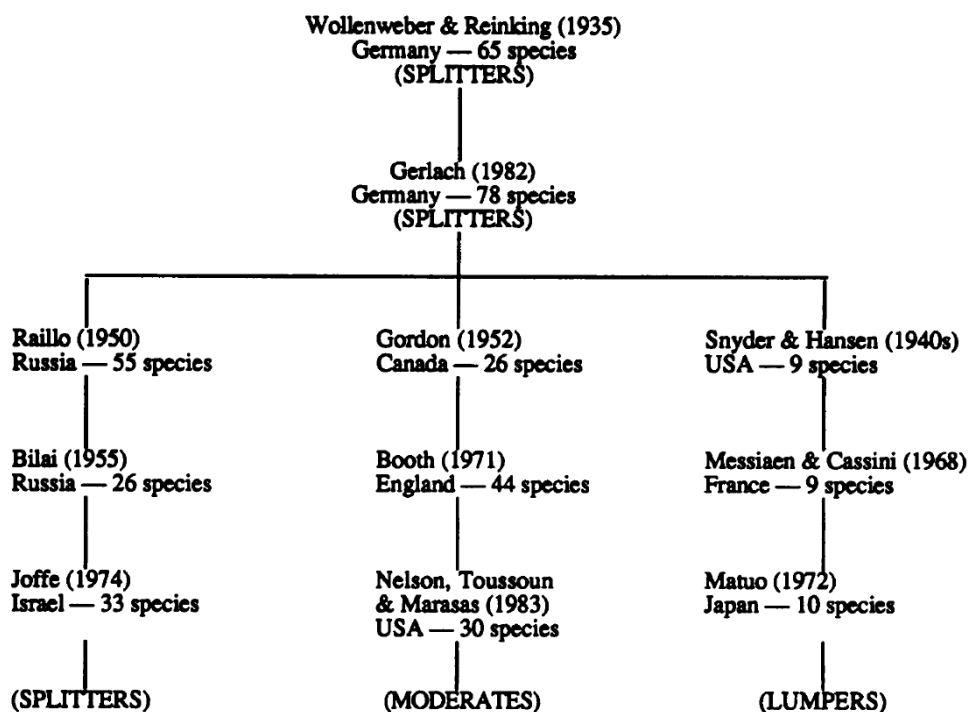
Al principio, la mayoría de las investigaciones del género *Fusarium* se enfocaron en el diagnóstico y la identificación de las especies causantes de enfermedades en las plantas (Leslie y Summerell 2006). Antes de 1900, hubo una proliferación en el número de especies descritas lo que se atribuyó, en parte, a la variabilidad de especies presentes en las muestras estudiadas de *Fusarium*, así como a los criterios inadecuados para delimitar taxones (Burgess *et al.*, 1996). En el periodo de 1809-1935, más de 1.000 especies fueron identificadas y caracterizadas dentro del género (Leslie y Summerell, 2006; Refai *et al.*, 2015).

Los taxonomistas de *Fusarium* pueden dividirse en “splitters”, “lumpers” y “moderates”, estos términos explican la filosofía empleada por los mismos en la determinación de especies de *Fusarium* (Figura 5) (Nelson *et al.*, 1994). Los “lumpers” agrupan a las especies relacionadas a nivel de subespecie, mientras que los “splitters” consideran como especie lo que los “moderates” considerarían como variedad (Wickens, 2001).

Wollenweber fue el pionero en la investigación taxonómica sobre *Fusarium* a través del estudio que llevó a cabo sobre una amplia gama de cultivos de diferentes regiones climáticas. El trabajo que realizó con Reinking y que se publicó en 1935, "Die fusarien", y se convirtió en la base sobre la que todos los sistemas taxonómicos posteriores se desarrollaron (Burgess *et al.*, 1996). Wollenweber y Reinking organizaron el género en 16 secciones, que incluyeron 65 especies, 55 variedades y 22 formas especiales. Los principales criterios discriminantes entre las secciones se basaron en la morfología; particularmente, en la presencia y la forma de los

microconidios, la presencia y posición de las clamidosporas en las hifas, la forma de los macronidios y sus células basales (Nelson, 1991; Nelson *et al.*, 1994; Burgess *et al.*, 1996; Moretti *et al.*, 2009).

En la década de 1940, Snyder y Hansen publicaron los resultados de sus estudios sobre la taxonomía de las especies de *Fusarium* en tres documentos (Snyder y Hansen 1940, 1941, 1945, Nelson *et al.*, 1994). En esencia, se redujo el número de especies a 9 y 4 secciones (*Arthrosporiella*, *Discolor*, *Gibbosum* y *Roseum*) de las 16 reconocidas por Wollenweber y Reinking fueron agrupadas en una única especie *F. roseum* (Snyder y Hansen 1945; Burgess *et al.*, 1996). Dicha agrupación no fue completamente aceptada, principalmente por los fitopatólogos, ya que algunas especies de importancia económica como *F. culmorum* y *F. graminearum* fueron tratados como sinónimos de *F. roseum*. El uso generalizado de este nombre en los trabajos publicados durante este período condujo a la pérdida de información valiosa sobre la patología y la toxicología de las especies incluidas dentro de *F. roseum* (Thrane, 1989; Burgess *et al.*, 1996).



**Figura 5.** Relación entre los taxonomistas involucrados en el estudio del género *Fusarium*. Tomado de Nelson *et al.*, 1994

Raillo estudió las características morfológicas útiles de la taxonomía y concluyó que la forma de la célula apical del conidio era la característica principal para la

determinación de las especies de *Fusarium*. Por su parte, Bilai reconoció la importancia de la variación o mutación cultural en la taxonomía de *Fusarium*. Sobre la base de sus resultados, organizó el género en 9 secciones, 26 especies y 29 variedades. (Nelson *et al.*, 1994).

Otro referente para este desarrollo taxonómico fue Gordon, quien trabajó en Canadá desde 1930 hasta 1960 con especies de *Fusarium* (Gordon, 1944; 1952; 1954a; 1954b; 1956a; 1956b; 1959; 1960). Posteriormente, Messiaen y Cassini en Francia siguieron el sistema propuesto por Snyder y Hansen, pero utilizaron variedades botánicas en lugar de los cultivares en las subespecies de *F. roseum*. Estos investigadores aportaron descripciones para cada variedad y proporcionaron una clave para todo el sistema (Nelson *et al.*, 1994).

Años más tarde, en 1971, Booth modificó y amplió el sistema de Gordon, con la introducción de información sobre los estados perfectos. Una contribución importante fueron los datos sobre ontogenia conídica (conidióforos y células conidiógenas), útiles en la taxonomía de las especies de *Fusarium*. Además, indicó la importancia de la presencia de polifiálides frente a monofiálides para la separación de secciones y especies (Nelson, 1991; Nelson *et al.*, 1994).

Joffe (1974) examinó un gran número de aislamientos de *Fusarium* provenientes del suelo, de plantas marchitas o en descomposición y de semillas. Este autor incluyó 13 secciones, 33 especies y 14 variedades. Las técnicas utilizadas en el estudio de *Fusarium* y el establecimiento de nuevas especies que realizó Gerlach en Alemania, permitieron que él se colocara dentro de los “splitters”, como se evidencia en su clasificación que incluye 78 especies, que aparecieron en el atlas que publicó junto con Nirenberg en 1982 (Nelson, 1991; Nelson *et al.*, 1994).

Nelson *et al.* (1983) seleccionaron las mejores partes de varios sistemas y las combinaron con resultados de su investigación, para desarrollar un sistema en el que se enfatizó la utilidad práctica para la identificación. Su sistema incluyó a *F. oxysporum* y a *F. solani* como fueron descritos por Snyder y Hansen, y la información sobre los conidióforos, como fue descrita por Booth. En su trabajo se redujo el número de especies y las variedades y formas fueron combinadas con las especies apropiadas (Nelson, 1991; Nelson *et al.*, 1994).

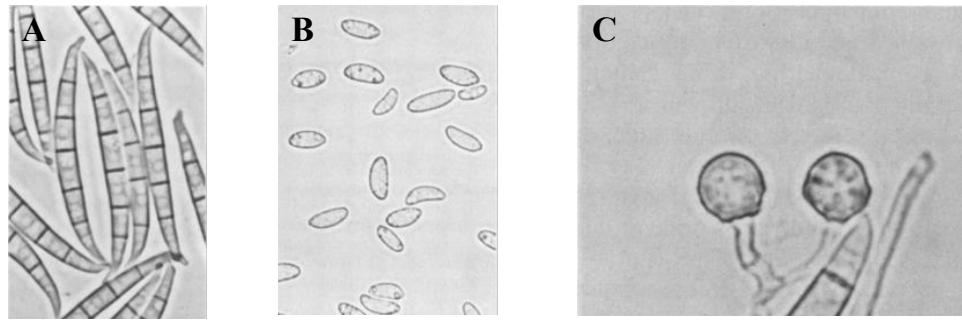
Leslie y Summerell (2006) resumen la información de 70 especies de *Fusarium*. Esta publicación monográfica fue el primer documento en integrar la información morfológica y la filogenética del género (Refai *et al.*, 2015).

### **1.3.2. Características morfológicas y culturales del género *Fusarium***

Muchas especies del género *Fusarium* muestran un grado considerable de variación con respecto a las características morfológicas, culturales y biométricas. Esta capacidad de variación puede explicar, en parte, la habilidad de las especies de *Fusarium* para colonizar diversos nichos ecológicos del mundo. Sin embargo, la variación ha dado lugar a ciertas limitaciones en el desarrollo de un sistema taxonómico estable y ampliamente aceptado para el género (Nelson *et al.*, 1994). Varios taxones dentro del género son reconocidos por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (basados en las características morfológicas) e incluyen secciones, especies y variedades. Todavía algunas subdivisiones dentro de las especies de *Fusarium* se basan en la fisiología (formas especiales y razas) o la genética (grupos de compatibilidad vegetativa), que no son reconocidas por el Código (Windels, 1991).

Una característica taxonómica común a las especies de *Fusarium* es la producción de macroconidios que poseen una forma distintiva (fusiforme). Esta característica, cuando se combina con otras, compone la base para la identificación específica del género *Fusarium* (Windels, 1991). En estas especies se pueden encontrar 3 tipos de esporas: macroconidios, microconidios y clamidosporas (Figura 6) (Moretti *et al.*, 2009). Se han observado también, conidios intermedios en tamaño y forma denominados mesoconidios, característicos de *F. semitectum* Berkeley y Ravenel, *F. avenaceum* y *F. subglutinans* (Wollenweber y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas (Nelson *et al.*, 1994).

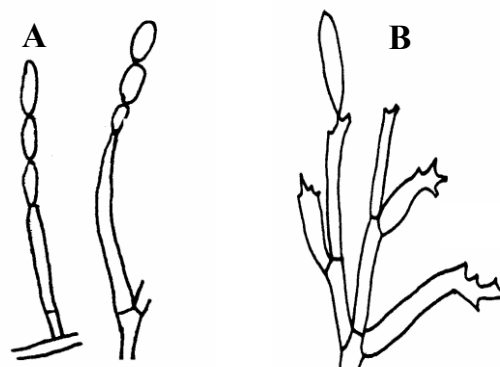
La **morfología de los macroconidios** es el rasgo clave para la caracterización no solamente de las especies, sino también del género *Fusarium*. La forma de los macroconidios desarrollados en esporodoquios, para una especie dada, es relativamente consistente y una característica constante cuando el hongo se cultiva en sustratos naturales y en condiciones estándar (Nelson *et al.*, 1994).



**Figura 6.** Esporas producidas por las especies del género *Fusarium*. (A) macroconidios de *F. graminearum*; (B) microconidios de *F. solani* y (C) clamidosporas de *F. oxysporum*. Tomado de Nelson *et al.*, 1994.

La presencia o ausencia de **microconidios** es una de las características principales utilizada para la identificación taxonómica de las especies del género. Si están presentes, las características que se consideran son su forma, origen y agrupamiento (Nelson *et al.*, 1994). La formación de los microconidios se observa mejor *in situ*, en un sustrato natural, como el medio de cultivo agar hojas de clavel (AHC) (Fisher *et al.*, 1982). La morfología de la célula conidiógena (observación de la ontogenia conídica) es una característica taxonómica primaria. Estas células conidiógenas pueden ser monofiálides (Figura 7) o monofiálides y polifiálides (Nelson *et al.*, 1994).

La presencia o ausencia de **clamidosporas** es fundamental en la taxonomía. Si están presentes, se encuentran por separado, en parejas, en grumos o en cadenas, ya sea con paredes rugosas o lisas (Nelson *et al.*, 1994). Pueden producirse tanto a partir del micelio como a partir de los macroconidios.



**Figura 7.** Morfología de la célula conidiógena (A) monofiálides y (B) polifiálides. Tomado de Carrillo 2003.

La morfología y la **pigmentación** de la colonia fúngica, incluidas la presencia o **ausencia de esporodoquios, esclerocios o estroma**, son características útiles para describir una especie cuando se realizan los cultivos bajo condiciones controladas de sustrato, luz y temperatura; sin embargo, no deben considerarse como criterios adecuados para la diferenciación. En algunos casos, la pigmentación de las colonias que se desarrollan en medios ricos en carbohidratos es variable. Booth (1971) utilizó también, como una característica taxonómica, la tasa de crecimiento lineal del hongo bajo condiciones controladas.

### **1.3.3. Complejo de especies de *Fusarium graminearum***

La estructura del género *Fusarium* es polifilética y agrupa especies anamorfos de diferentes géneros teleomorfos del orden Hypocreales (O'Donnell, 1996)

Debido a las diferencias de fertilidad y la manifestación fitopatológica, la especie *F. graminearum* fue dividida en dos grupos. El grupo 1, asociado a la podredumbre de la corona, fue redefinido como *F. pseudograminearum*, mientras que el grupo 2 se mantuvo como *F. graminearum* (Aoki y O'Donnell, 1999; O'Donnell *et al.*, 1998), al cual O'Donnell *et al.* (2000) asignaron 7 linajes biogeográficos monofiléticos, definidos con base en la relación de secuencias de ADN de una serie de genes polimórficos. En el hemisferio sur se encontraron los linajes 1 a 5; y, los linajes 6 y 7 en el hemisferio norte.

Posteriormente, el análisis filogenético de secuencias del gen  $\beta$ -tubulina y de la región intergénica del ADN ribosomal (IGS), permitieron determinar 9 especies distintas dentro de *F. graminearum*; pero morfológicamente indistinguibles, (O'Donnell *et al.*, 2004). Otros trabajos elevaron a 13 el número de especies que conformarían el complejo de especies de *F. graminearum* (FGSC, acrónimo en inglés de *Fusarium graminearum* Species Complex) (Starkey *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2008; Yli-Mattila *et al.*, 2009).

Actualmente, el complejo FGSC posee al menos 16 especies diferentes. Ciertas especies manifiestan distribuciones geográficas específicas (*F. asiaticum* y *F. graminearum sensu stricto* abundan en China); o exhiben preferencia de hospedero (trigo, maíz, cebada o arroz) (Hao *et al.* 2016). *Fusarium graminearum sensu stricto* es dominante en trigo en China y Brasil (Del Ponte *et al.*, 2014). En la Argentina, se ha identificado únicamente la presencia de *F. graminearum sensu stricto* como patógeno



de trigo (Ramírez *et al.*, 2007; Sampietro *et al.*, 2010). Además, se han encontrado cepas pertenecientes a *F. meridionale* y *F. boothii* en maíz (Sampietro *et al.*, 2010).

#### **1.3.4. Herramientas moleculares utilizadas en la identificación**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, acrónimo en inglés de Polymerase Chain Reaction), descrita en la década de 1980 (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986), revolucionó la biología molecular (Reece, 2004) y los procedimientos de diagnóstico fitopatológicos (Martínez-de la Parte *et al.*, 2014). Este método permite la amplificación de millones de copias de secuencias específicas de ADN, que se obtienen al repetir ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión que se producen a distintas temperaturas. Para esta reacción, se utilizan oligonucleótidos específicos (cebadores), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y una polimerasa termoestable (Taq polimerasa) en un tampón adecuado. Las principales ventajas de las técnicas de PCR incluyen la alta sensibilidad, la especificidad y la fiabilidad (Capote *et al.*, 2012).

Los tres pasos en cada ciclo de PCR son los siguientes (Reece, 2004):

- i. Desnaturalización: las dos cadenas de la molécula de ADN se separan por calentamiento. Este paso se realiza frecuentemente a 94°C.
- ii. Hibridación: entre 45 a 60°C se favorece la hibridación del cebador con las secuencias complementarias del ADN.
- iii. Extensión: la Taq polimerasa se une al extremo 3' libre del cebador y adiciona nucleótidos para sintetizar la nueva cadena de ADN en la dirección 5' a 3', a una temperatura óptima de 72°C.

En muchos casos, la biología molecular ha facilitado la identificación de patógenos fúngicos a partir de sus secuencias de ADN. En los últimos años, ha habido un gran progreso en el desarrollo de las herramientas y técnicas de biología molecular para el estudio de la variación genética entre los aislamientos fúngicos, la taxonomía y la epidemiología asociada con hongos (Refai *et al.*, 2015).

La taxonomía clásica del género *Fusarium* se ha beneficiado con técnicas de biología molecular empleadas para resolver algunas limitaciones como la dificultad de diferenciar hongos estrechamente relacionados, delimitar eficientemente algunos taxones y la laboriosidad de los métodos (Guarro *et al.*, 1999).

Para el estudio taxonómico de hongos se emplean comúnmente las secuencias de los genes que codifican para sus ARNr y sus regiones espaciadoras internas (ITS). Es frecuente la tendencia a realizar análisis multigénicos con el propósito de incrementar el grado de confianza de los resultados obtenidos. Además de los genes mencionados, para el género *Fusarium* se utilizan genes estructurales que codifican proteínas como  $\beta$ -tubulina (BT2, TUB), el factor de elongación 1 $\alpha$  de la traducción (EF-1 $\alpha$ ) y la calmodulina (CAL) (Taylor y Fisher, 2003). Los genes estructurales EF-1 $\alpha$  y RPB2 han demostrado tener un alto nivel de resolución para el género *Fusarium*, porque discriminan especies incluso dentro de complejos de especies (Geiser *et al.*, 2004; Balajee *et al.*, 2009).

En la actualidad existen bases de datos que permiten el acceso a secuencias de genes de especies de *Fusarium*, entre estas se encuentran la Fusarium MLST Database y FUSARIUM-ID (Geiser *et al.*, 2004; Balajee *et al.*, 2009; <http://www.westerdijknstitute.nl/fusarium/>).

#### **1.4. Micotoxicosis y producción de micotoxinas por especies del género *Fusarium***

Los daños ocasionados por la FET incluyen pérdidas en el rendimiento como consecuencia de la reducción del número y del peso de los granos (Bai *et al.*, 2001). A esto se suma la contaminación de los granos con micotoxinas, metabolitos secundarios persistentes y termoestables sintetizados por los patógenos durante el proceso infectivo, que pueden acumularse en alimentos, piensos o forrajes y, en dosis relativamente bajas, causar problemas de salud en humanos y animales (Kendrick, 1992; de Galich, 2002; Atanda *et al.*, 2013).

En la Edad Media se evidenció el impacto de las micotoxinas cuando los alcaloides producidos por diversas especies de *Claviceps*, que ocasionan el cornezuelo del centeno, intoxicaron a un gran número de personas en Francia durante el año 945 (van Dongen y de Groot, 1995; Peraica y Domijan, 2001). Posteriormente, entre los años 1940 y 1950, una enfermedad letal para el ser humano causada por toxinas de especies del género *Fusarium*, denominada “Leucopenia Tóxica Alimentaria (ATA)” se reportó en Rusia. Del mismo modo, en 1938 en Japón la citreoviridina, producto metabólico de *Penicillium citreonigrum*, fue la responsable de la “enfermedad del arroz amarillo” que produjo en los humanos una cardiomiopatía letal, con lesiones similares a las observadas en el beri-beri (Peraica y Domijan, 2001).

La industria ganadera también se ha visto afectada por las micotoxinas. En 1822, en Nueva Zelanda se produjo la devastación de la producción ovejera a causa de eczema facial, una infección micótica causada por *Pithomyces chartarum*. Entre otros síndromes letales ocasionados por hongos se encuentran la leucoencefalo-malacia equina (*F. verticillioides*, reportada en EE.UU. entre 1930 y 1970; la stachybotryotoxicosis (*Stachybotrys chartarum*), en la URSS en 1930; y, la enfermedad del moho rojo (*Neurospora sitophila*), en Japón entre 1945 y 1947 (Atanda *et al.*, 2013).

En 1965 Blount mencionó que, a pesar de los antecedentes, la atención que se prestó a las enfermedades fúngicas fue escasa. Sin embargo, en 1960, cuando la “enfermedad X de los pavos” mató a miles de animales de corral en Gran Bretaña; el mundo tomó conciencia de los riesgos asociados a las micotoxinas y respondió al desastre mediante un enfoque sistemático y multidisciplinario, que llevó al descubrimiento de las aflatoxinas como contaminantes mortales presentes en el cultivo de maní (Atanda *et al.*, 2013).

La globalización del comercio de productos agrícolas ha contribuido, de manera significativa, a la comprensión de los riesgos potenciales de las micotoxinas (Zaki *et al.*, 2012). Comúnmente se considera que los productos naturales son seguros; sin embargo, la contaminación de alimentos humanos o animales con toxinas naturales puede generar problemas e incluso enfermedades graves (Yiannikouris y Jonany, 2002).

Ninguna región del mundo está exenta del problema que implica la presencia de micotoxinas, que en ciertas áreas geográficas se producen más fácilmente que en otras (Akande, 2006). Así, en África y en Asia prevalece la producción de aflatoxinas; en Australia dominan las aflatoxinas y fumonisinas; en América del Norte, las aflatoxinas, ocratoxina, zearalenona (ZEA) y los tricotecenos; en América del Sur se encuentran aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina, tricotecenos (DON y la toxina T-2); en Europa del Este, la ZEA y los tricotecenos; y en las regiones de Europa Occidental la ocratoxina, ZEA y los tricotecenos (Iheshiulor *et al.*, 2011).

En la década de 1990 ya se consideraba que las micotoxinas producían pérdidas del orden de los miles de millones de dólares (Trail *et al.*, 1995). En 2005, Lowlor y Lynch (citado por Iheshiulor *et al.*, 2011) estimaron que las micotoxinas afectaban hasta un

25% de los cultivos mundiales cada año. La conciencia de la seguridad en la producción de alimentos y piensos ha aumentado, ya que los métodos para las pruebas de residuos y sustancias indeseables son cada vez más sofisticados y están disponibles en todos los puntos de la cadena de suministro (Zaki *et al.*, 2012).

Muchos de los hongos toxigénicos están ampliamente distribuidos en el planeta. La microbiota natural relacionada con la producción de alimentos está dominada por tres géneros: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Pitt, 2000), que producen las micotoxinas aflatoxinas, ocratoxina, tricotecenos, ZEA, fumonisinas y/o patulina, consideradas de alta preocupación, por su toxicidad y ocurrencia (Akande, 2006; Malbrán, 2013; Cano-Sancho *et al.*, 2014).

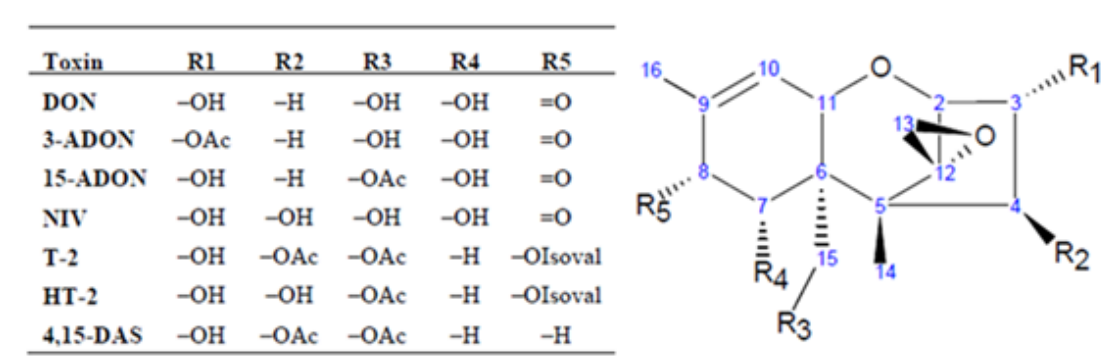
#### **1.4.1. Estructuras y propiedades de las micotoxinas producidas por especies del género *Fusarium***

Entre las micotoxinas producidas por especies del género *Fusarium*, las de mayor importancia son los tricotecenos, la ZEA y las fumonisinas (D'Mello, 2004).

##### **1.4.1.1. Tricotecenos**

Constituyen el grupo más importante de micotoxinas producidas por las especies del género *Fusarium* (Peraica y Domijan, 2001). Se identificaron como tricotecenos después del descubrimiento de la tricotecina, un metabolito antifúngico producido por *Trichothecium roseum* (Freeman y Morrison, 1949). Basado en el esqueleto de la tricotecina, Grove (1988) aisló un total de 148 tricotecenos (WHO, 1990), posteriormente Grove (1996) describió 182 tricotecenos en su trabajo “Tricotecenos no-macrocíclicos, parte 2”.

Los tricotecenos son sesquiterpenoides cíclicos, compuestos por un núcleo central de anillos de ciclohexeno y tetrahidropirano fusionados. Además, una parte de un ciclopentilo también está fusionada al anillo de tetrahidropirano, a través del C<sub>2</sub> y C<sub>5</sub> (Foroud y Eudes, 2009). Se clasifican de acuerdo con la presencia o ausencia de grupos funcionales característicos (Figura 8). Todos los tricotecenos poseen un epóxido en la posición del C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub>, que es responsable de su actividad toxicológica. En general, los tricotecenos son resistentes a la degradación por factores ambientales, que incluyen la luz y la temperatura. Son compuestos no volátiles (Sudakin, 2003).

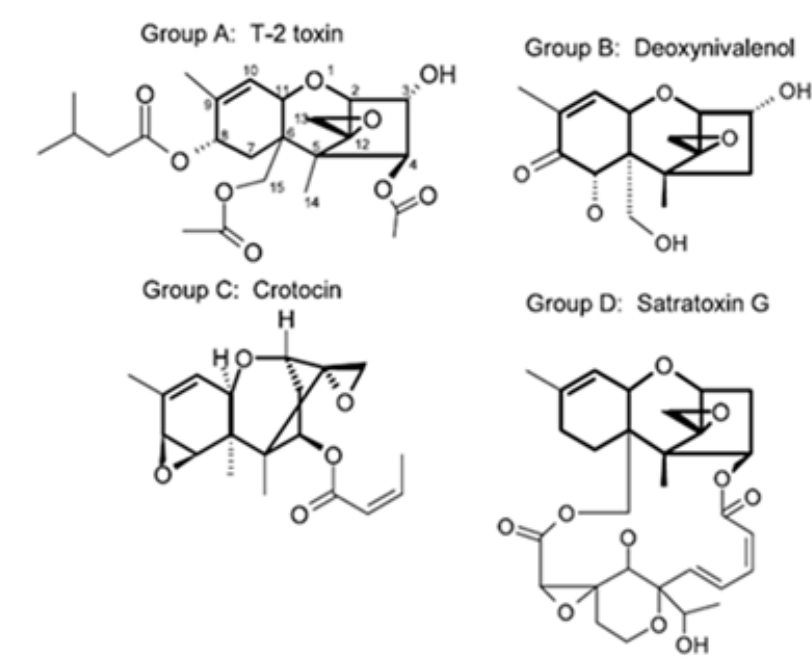


**Figura 8.** Estructura química de los tricotecenos. Tomado de Foroud y Eudes, 2009.

Se subdividen en cuatro grupos básicos. Los tricotecenos de tipo A y de tipo B se diferencian por la presencia o ausencia de un grupo carbonilo en la posición C<sub>8</sub>; los de tipo C poseen un grupo epóxido adicional, en las posiciones C<sub>7</sub> y C<sub>8</sub> ó C<sub>9</sub> y C<sub>10</sub>; y, los de tipo D contienen un anillo macrocíclico, entre las posiciones C<sub>4</sub> y C<sub>15</sub> (Figura 9) (Sudakin, 2003).

Los tricotecenos pertenecientes a los grupos A y B son los más importantes ya que son producidos por las especies relacionadas con la FET. Dentro del primer grupo, se encuentran las toxinas T-2 y HT-2, producidas por *F. sporotrichioides* y *F. poae*. Dentro del grupo B están los tricotecenos DON y sus derivados acetilados, 3-ADON y 15-ADON; y, NIV y su derivado acetilado 4-acetil NIV (o fusarenona X) (Mirocha *et al.*, 2003). La producción de estas micotoxinas usualmente está vinculada con *F. graminearum*, aunque Abramson *et al.* (1993) ha citado a *F. avenaceum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. poae* y *F. sporotrichioides* como posibles productores.

La fitotoxicidad del DON y de otros tricotecenos fue caracterizada desde los primeros años de su estudio (Miller *et al.*, 2001). Estos compuestos producen clorosis, necrosis o marchitamiento de las plantas susceptibles (McCormick, 2003) y se relacionarían con los mecanismos de la acción patógena de los hongos. Al ingresar los tricotecenos a los tejidos de la planta, inhibirían la síntesis de proteínas necesarias para la activación de los mecanismos de defensa de la planta, lo que facilitaría el crecimiento del hongo.



**Figura 9.** Estructura química de algunos de los representantes de los cuatro grupos básicos de tricotecenos. Tomado de Sudakin, 2003.

Se ha reportado que podría existir una correlación entre la agresividad de los aislamientos y la producción de DON por parte de *F. graminearum* y *F. culmorum* (Desjardins *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2006). Posiblemente la capacidad del aislamiento para infectar trigo o maíz no se vea significativamente afectada con la menor producción de estas micotoxinas, pero la menor agresividad consecuente puede reducir el avance y la extensión de la infección (Proctor *et al.* 1995; 1997).

En el cultivo de trigo, cebada y maíz, el tricoteceno más frecuentemente encontrado como contaminante es el DON. Debido a que estos cultivos constituyen las dos terceras partes de la producción mundial de cereales, el DON es considerado como la micotoxina más importante en el mundo en términos de exposición humana (Miller *et al.*, 2001). No se conocen con exactitud los niveles de DON que pasan a la sémola; sin embargo, Dexter *et al.* 1997 mencionan que podría ser alrededor del 50%. En spaghetti y tallarines cocidos la concentración de DON es menor ya que esta micotoxina se lixivia al agua durante el proceso de cocción (Nowicki *et al.*, 1998).

Un criterio de clasificación de los aislamientos fúngicos que también se utiliza ampliamente se fundamenta en la naturaleza química de las micotoxinas producidas por ellos. El quimiotipo de microorganismos o de plantas, tradicionalmente, se ha definido

como el fenotipo químico y generalmente se determina mediante análisis químicos; mientras que el genotipo fue definido como la constitución genética o secuencia de ADN. Mediante la caracterización genética, con ayuda de una reacción de PCR, es posible predecir el quimiotipo de hongos y plantas de importancia en la alimentación y la agricultura (Desjardins, 2008).

De acuerdo con la naturaleza de los tricotecenos que producen, los aislamientos de *F. graminearum* pueden pertenecer a uno de los siguientes tres quimiotipos (Moss y Thrane, 2004):

- i. Ia ó 3-ADON, que produce principalmente DON y 3-ADON.
- ii. Ib ó 15-ADON, que produce principalmente DON y 15-ADON.
- iii. II ó NIV, que produce principalmente NIV y 4-ANIV.

A nivel mundial se ha observado variación en el potencial toxigénico de poblaciones de *F. graminearum*. En Europa, el quimiotipo 15-ADON se ha encontrado con mayor frecuencia en países como Francia, Alemania, Italia, Luxemburgo y Turquía; en diferentes regiones de Rusia y países cercanos se ha encontrado la predominancia del quimiotipo 3-ADON, al igual que en Escandinavia y Finlandia (Castañares *et al.*, 2014). Aunque en América del Norte el quimiotipo 15-ADON predomina, se ha reportado un aumento en la incidencia del quimiotipo 3-ADON (Ward *et al.*, 2008). En algunos países de América del Sur (Brasil y Uruguay) el quimiotipo predominante en trigo es el 15-ADON (Del Ponte *et al.*, 2014). En la Argentina, también se ha determinado que predomina en las poblaciones de *F. graminearum* el quimiotipo Ib (Lori *et al.*, 2003; Malbrán *et al.*, 2014).

La vía biosintética de los tricotecenos ha sido bien detallada. El proceso se encuentra regulado por el gen *Tri6* (Matsumoto *et al.*, 1999). Generalmente, el funcionamiento del gen *Tri13* determina la producción de DON o NIV (Lee *et al.*, 2001; 2002)

En general, la biosíntesis de micotoxinas en *F. graminearum* parece ser más sensible a la temperatura que a la disponibilidad de agua (Llorens *et al.*, 2004). Se ha observado que, en condiciones de campo, la cantidad de micotoxina recuperada depende de la época del año en la que se recolectó la muestra (Champeil *et al.*, 2004); mientras

que, en laboratorio se visualizó que el aumento en la producción de DON está ligado a la humedad relativa (Beyer *et al.*, 2005).

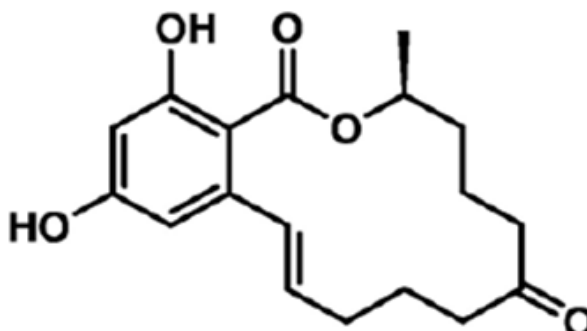
Diferentes métodos moleculares para la determinación del quimiotipo han sido desarrollados durante los últimos 10 años (Chandler *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Quarta *et al.*, 2006; Starkey *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Estos métodos se basan en el polimorfismo de genes codificantes e intrones (*Tri3*, *Tri7*, *Tri12*, *Tri13*) del locus TRI, que contiene la mayor parte de los genes implicados en la síntesis de tricotecenos. Este locus ha evolucionado paralela e independientemente del resto del genoma (Ward *et al.*, 2002) y resulta útil para analizar la estructura de las poblaciones de *F. graminearum*. En este sentido, la determinación de los quimiotipos se ha utilizado para discriminar linajes dentro de *F. graminearum* (Lee *et al.*, 2009). En general, el complejo FGSC produce básicamente tricotecenos del grupo B, como NIV, 3-ADON y 15-ADON (Ward *et al.*, 2002).

La biosíntesis de los tricotecenos inicia cuando el farnesil pirofosfato se cicla en un producto tricoteceno no tóxico, denominado tricodieno, bajo la acción catalítica de la enzima tricodieno sintasa (TRI5), codificada por el gen *Tri5* (Hohn y Vanmiddlesworth, 1986; Desjardins *et al.*, 1993). Se ha observado que la inactivación del gen *Tri5* no altera la capacidad de las cepas de *F. graminearum* para infectar la espiga de maíz, pero disminuye la agresividad de los mutantes (Proctor *et al.*, 1995; Desjardins *et al.*, 1996). La enzima citocromo P450 monooxigenasa multifuncional, TRI4, cataliza las siguientes 4 etapas de la ruta (hidroxilación, epoxilación y 2 hidroxilaciones más) (Hohn *et al.*, 1995). El producto final de la actividad TRI4, el isotricotriol, se somete a dos pasos no enzimáticos de isomerización (McCormick *et al.*, 1990), que incluyen una ciclación que produce enlaces C-O, entre el oxígeno del C<sub>2</sub> y C<sub>11</sub>. El producto, isotricodermol, que forma la estructura del esqueleto del tricoteceno, se acetila en el C<sub>3</sub> por acción de TRI101 (McCormick *et al.*, 1999), y es hidroxilado por TRI11 en el C<sub>15</sub>, para producir 15-deacetilcalonectrina (Alexander *et al.*, 1998). La 15-deacetilcalonectrina puede actuar como un sustrato para la producción de DON, por hidroxilación del C<sub>3</sub> y C<sub>7</sub> y la adición de un grupo cetona en el C<sub>8</sub>. Puede ser acetilado por la actividad de TRI3 en el C<sub>15</sub>, para producir calonectrina (McCormick *et al.*, 1996). La calonectrina sirve como sustrato para la síntesis de los derivados acetilados de DON y NIV (3, 15-diacetildeoxynivalenol, 15-acetildeoxinivalenol y 4-acetilnivalenol (Desjardins, 2008).



#### 1.4.1.2. Zearalenona (ZEA)

La ZEA es una micotoxina insoluble en agua y termoestable (Figura 10) (Akande *et al.*, 2006), producida por *F. graminearum* y otras especies del género *Fusarium* (Zain, 2011). Con frecuencia esta micotoxina se encuentra en el maíz. Sin embargo, a nivel mundial, se la ha encontrado también en otros cultivos importantes, como trigo, cebada, sorgo y centeno (Richard, 2007).



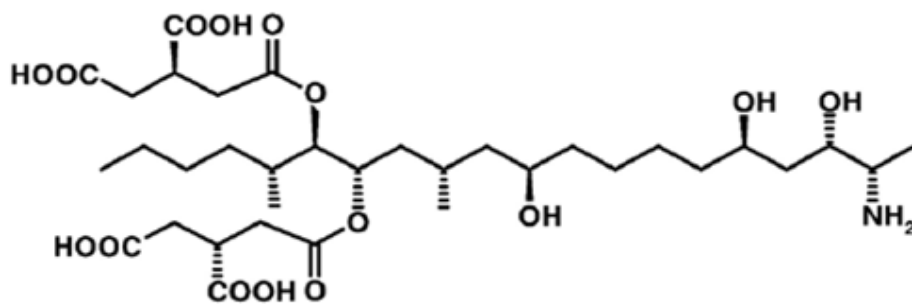
**Figura 10.** Estructura química de la zearalenona (ZEA). Tomado de Richard, 2007.

Es un compuesto no esteroideo que presenta actividad similar al estrógeno en vacas, ovejas y cerdos (Zain, 2011; Richard, 2007). La ZEA habitualmente se produce como co-contaminante con ciertos tricotecenos (D'Mello, 2004).

#### 1.4.1.3. Fumonisin

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas clasificadas en 6 tipos (FA<sub>1</sub>, FA<sub>2</sub>, FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub> y FB<sub>4</sub>). La serie A contiene amidas y la serie B posee una amina libre (Gelderblom *et al.*, 1992). Son toxinas no fluorescentes, termoestables (Dupuy *et al.*, 1993; Ariño, 2008), fotoestables y solubles en agua (International Agency for Research on Cancer, 1993). En 1988, se describió por primera vez su estructura química y hasta el momento se han encontrado más de 28 homólogos. La estructura B<sub>1</sub> es la más común y la más estudiada dentro del grupo (Cano-Sancho *et al.*, 2014).

Son producidas por especies de *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, cuyas cepas varían en su capacidad productora de esta toxina. El maíz es el principal producto afectado por este grupo de compuestos, aunque también se han encontrado, con menor frecuencia, en sorgo, arroz y trigo (Cendoya *et al.* 2018). A partir de granos de maíz asintomáticos se ha identificado una cantidad considerable de fumonisinas (Richard, 2007).

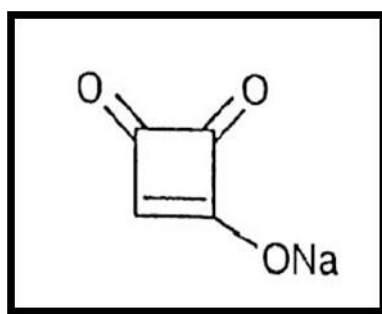


**Figura 11.** Estructura química de la fumonisina B<sub>1</sub>. Tomado de Richard, 2007.

#### 1.4.1.4. Moniliformina (MON)

La MON o ácido semi-cuadrado son nombres comunes para el compuesto 3-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona. Steyn *et al.* establecieron que la estructura química de MON es inusual para un producto natural (Figura 12). Debido al bajo valor de pKa ( $< 1,7$ ), MON no se encuentra como ácido libre en la naturaleza, pero abunda como una sal soluble sódica o potásica (Peralta y Degrossi, 2004).

Es una micotoxina producida al menos por una treintena de especies de *Fusarium* principalmente, entre las fitopatógenas, se encuentran *F. proliferatum* y *F. subglutinans*; se ha encontrado como contaminante natural de diferentes sustratos en distintas áreas geográficas (De Nus *et al.*, 1996; Fotso *et al.*, 2002; Hallas-Møller *et al.*, 2016; Zain, 2011). En maíz, esta toxina es producida por *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. temperatum*; mientras que en trigo la produce *F. avenaceum* (Chelkowski, 1998; Lew *et al.*, 1996; Sainz *et al.*, 2012). La información que existe sobre los efectos perjudiciales de MON sobre los animales aún es limitada, ya que no se han realizado estudios en profundidad por considerar que esta no es una micotoxina de tipo cancerígena y que debe ser consumida en altas cantidades para producir efectos tóxicos significativos (Peralta y Degrossi, 2004).



**Figura 12.** Estructura química de la moniliformina. Tomado de Peralta y Degrossi, 2004.

#### **1.4.2. Efecto de las micotoxinas sintetizadas por especies del género *Fusarium* sobre la salud humana y animal**

Las sustancias tóxicas son casi omnipresentes en el ambiente (Vasanthi y Bhat, 1998; Bhat y Vasanthi, 2003). Se han establecido 3 vías de exposición humana a compuestos tóxicos: oral, respiratoria y dérmica. La exposición oral es la más común, se produce a partir de la ingesta de alimentos preparados con plantas y productos animales contaminados con metabolitos tóxicos. La exposición respiratoria se produce por el contacto con cantidades grandes de alimentos almacenados, por permanecer en habitaciones altamente contaminadas o en oficinas con ventilación artificial. Finalmente, la exposición dérmica está limitada a micotoxinas que pueden atravesar la barrera cutánea, como algunos tricotecenos (Peraica y Domijan, 2001).

Se conoce que los rumiantes, en general, poseen mayor tolerancia a las micotoxinas que las especies no rumiantes, gracias a la capacidad de desintoxicación por parte de la microflora que habita en el rumen. En este sentido, el ganado más sensible es el porcino; mientras que las aves de corral se encuentran en un punto intermedio (Ratcliff, 2002). La correcta gestión del riesgo que genera el consumo de micotoxinas depende del conocimiento de la absorción, el metabolismo, el traspaso y el perfil toxicológico de cada toxina (Kan y Meijer, 2007).

La toxicidad asociada con los metabolitos secundarios más relevantes producidos por especies de *Fusarium* relacionadas con la FET se detalla a continuación.

##### **1.4.2.1. Efectos de los tricotecenos.**

La manifestación más severa de toxicidad de los tricotecenos se produjo en la URSS, entre 1932 y 1947, cuando el 60% de las personas involucradas en el consumo de alimentos contaminados con la toxina T-2, producida por *F. sporotrichoides*, fallecieron como consecuencia de la ATA. Los síntomas iniciales fueron gastritis, gastro-enteritis, dolor abdominal, dolor de esófago y diarrea. El consumo prolongado de granos contaminados (3-4 semanas) produjo malestar general con vértigo, sabor desagradable en la boca con leucopenia progresiva, granulocitopenia y linfocitosis (Peraica y Domijan, 2001).

Los brotes más recientes de micotoxicosis producidas por tricotecenos fueron menos severos y no se registraron muertes (Peraica y Domijan, 2001). Eventos de

toxicosis agudas han ocurrido en Japón (Peraica y Domijan, 2001), China (Luo, 1988) e India (Bhat *et al.*, 1989, Ramakrishna *et al.*, 1989). Los síntomas asociados con la enfermedad fueron dolor abdominal, náusea, vómito, diarrea, mareos y dolor de cabeza. Usualmente, los síntomas aparecieron horas después de la ingesta de trigo, maíz o arroz contaminados con DON, NIV, y/o toxina T-2 (Peraica y Domijan, 2001).

En animales y humanos, el DON produce toxicidad aguda, altera el funcionamiento del sistema inmunológico, tiene efecto hemolítico e inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Los principales síntomas asociados a su consumo son vómito, rechazo de alimento (síndrome anoréxico), pérdida de peso y diarrea (Lori y Rizzo, 2007).

#### **1.4.2.2. Efectos de la zearalenona**

La ZEA imita el efecto de los estrógenos femeninos. En dosis bajas, aumenta el tamaño de las glándulas mamarias y de los órganos reproductivos; mientras que en dosis más altas interfiere con la ovulación, la implantación, el desarrollo fetal y la viabilidad de los animales recién nacidos (Jones *et al.*, 1994). Se ha observado que la ZEA tiene efecto uterotrófico y la consecuente disminución de estrógenos provoca la inhibición del hipotálamo y pituitaria anterior, así como la atrofia de ovarios, testículos, próstata y vesículas seminales (Appelgren *et al.*, 1982; Farnworth y Trenholm, 1983).

En dosis elevadas, se la vincula con abortos en ganado lechero. Otras respuestas pueden incluir menor consumo de alimento, menor producción de leche, vaginitis, secreciones vaginales, bajo rendimiento reproductivo y la ampliación de la glándula mamaria en vaquillonas. Se recomienda que ZEA no exceda de 250 ppb ( $\text{ng kg}^{-1}$ ) en la dieta total (Jones *et al.*, 1994).

Existen varios reportes sobre el agrandamiento de mamas y el desarrollo sexual precoz de infantes, posiblemente conectados con la exposición a estrógenos relacionada con la ingesta de alimentos contaminados. En Puerto Rico, Cas encontró ZEA en muestras de sangre de infantes con desarrollo sexual precoz (Peraica y Domijan, 2001).

#### **1.4.2.3. Efectos de las fumonisinas**

Se ha encontrado que, en la mayoría de los animales, la presencia de estas micotoxinas deteriora la función inmunitaria, causa daño hepático y renal, disminuye el peso y aumenta las tasas de mortalidad. En cerdos, de manera específica, también causa

dificultades respiratorias (Jones *et al.*, 1994). Las fumonisinas incrementan la relación esfinganina/esfingosina, que se utiliza como un biomarcador de la exposición animal. Se demostró que los órganos blanco de la toxicidad de fumonisinas son el hígado (ratones, ratas, equinos, conejos, cerdos y primates no humanos), riñón (cerdos, ovejas, ratones y ratas), cerebro (caballos) y pulmones (cerdos) (WHO, 2000).

Se encontró que las fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> promueven el cáncer en ratas (Gelderblom *et al.*, 1984). La carcinogenicidad de la FB<sub>1</sub> varía entre especies, cepas y sexo de los roedores (Peraica y Domijan, 2001). Se ha reportado la ocurrencia de leucoencefalomalacia equina asociada al consumo de maíz contaminado con fumonisinas (Ross *et al.*, 1990). Un solo brote de micotoxicosis aguda humana se informó en 27 aldeas de la India, cuando los estratos sociales más pobres fueron expuestos a FB<sub>1</sub> procedente de maíz y de sorgo mohosos (Bhat *et al.*, 1997).

Debido a la pobre absorción y la rápida excreción en animales, las fumonisinas no se transfieren de forma significativa a los productos de origen animal como carne de cerdo, carne de pollo, huevos y leche (Prelusky *et al.*, 1996). Se ha propuesto que la ingesta diaria de fumonisinas en humanos no debería superar el 1 µg kg<sup>-1</sup> de peso corporal por día (Petersen y Thorup, 2001). De acuerdo con Miller *et al.* (1996), los límites admitidos de fumonisinas en alimento de animales es 5 µg g<sup>-1</sup> para caballos y otras especies equinas, 10 µg g<sup>-1</sup> para porcinos, 50 µg g<sup>-1</sup> para el ganado vacuno y 50 µg g<sup>-1</sup> para las aves de corral.

### 1.5. Justificación

En la actualidad, la enfermedad de mayor importancia para el trigo fideo es la FET, que ocasiona pérdidas en rendimiento como consecuencia de la reducción del número y peso de los granos (Bai *et al.*, 2001), además de problemas relacionados con la contaminación de los granos con micotoxinas (de Galich, 2002).

En la Argentina, estudios previos han permitido caracterizar las poblaciones de especies del género *Fusarium* causantes de la FET en trigo pan (Ramírez *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008; Kikot *et al.*, 2011; Malbrán *et al.*, 2012; 2014). Sin embargo, se conoce poco sobre la microbiota causante de la enfermedad en trigo fideo y sobre los riesgos potenciales que puedan provocar las especies productoras de micotoxinas (Lori y Sisterna, 2001; Lori *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2017). Existen indicios de la

influencia que tienen los procesos de industrialización del trigo fideo en el contenido de DON y en su distribución en los diferentes productos y subproductos resultantes de la molienda (sémola, pasta cruda y pasta cocida) (Visconti *et al.*, 2004; Brera *et al.*, 2013).

La identificación de las especies del género *Fusarium* a nivel de especie morfológica requiere de mucha práctica y es complicada para un investigador con poca experiencia (Abedi-Tizaki y Kazem, 2012). En Ecuador los estudios que se han destacado con relación a este género fúngico se realizaron sobre banano y plátano, por tratarse de uno de los principales productos de exportación del país. Sin embargo, desde hace algunos años ya se han encontrado indicios de la presencia de fusariosis en cereales (maíz), como también de distintas patologías causadas por especies de *Fusarium* tanto en cultivos extensivos como intensivos (Arias *et al.*, 1996; Sotomayor, 2012).

Considerando la necesidad de contar con profesionales especializados en el diagnóstico de las enfermedades causadas por especies de este género, la presente tesis se orientará al entrenamiento en la identificación y caracterización de especies del género *Fusarium* para que de esta manera en el Ecuador cuenten con especialistas en el tema. Es por ello que el desarrollo del presente proyecto incluyó una extensa revisión bibliográfica sobre la compleja taxonomía del género en estudio, así como el adiestramiento en las técnicas convencionales generales y específicas para la identificación de las especies del género *Fusarium* que permitan su posterior aplicación en el análisis integral de fusariosis de cereales u otros cultivos del Ecuador.

Dado que en la campaña 2012/13 las condiciones ambientales fueron altamente favorables para el desarrollo de la enfermedad en la Argentina (Alberione *et al.*, 2013), el presente proyecto plantea la caracterización morfológica y molecular de las especies de *Fusarium* que componen la micobiota asociada a la FET en 4 localidades de producción de trigo fideo. Esto permitirá, además, evaluar en los granos el potencial de contaminación con distintos grupos de micotoxinas producidas por las especies del género *Fusarium*.

## **Hipótesis**

Condiciones agroclimáticas como las del Este y las del Oeste de la Provincia de Buenos Aires generan diferencias cuantitativas en la composición de la micobiota causante de la Fusariosis de la espiga en trigo fideo, que determinan el potencial de contaminación de los granos con micotoxinas.

## **Objetivos**

- Analizar la composición de la micobiota asociada con la FET en distintas localidades de producción de trigo fideo.
- Determinar el efecto de las especies del género *Fusarium* presentes sobre la germinación de la semilla.
- Identificar a nivel de especie los aislamientos obtenidos con el empleo de marcadores morfológicos, fisiológicos y moleculares.
- Identificar a nivel genómico los quimiotipos de las especies de *Fusarium* vinculadas con la FET.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se recibieron muestras de granos de trigo fideo pertenecientes a la campaña 2012/13 de la Red de Ensayos Comparativos de Variedades de Trigo (RET) del Instituto Nacional de Semillas (INASE) procedentes de 4 localidades de la región triguera (Balcarce, Miramar, Cabildo y La Dulce). De cada localidad se obtuvieron muestras de 7 cultivares de trigo fideo (ACA 1801F, ACA 1901F, Buck Granate, Buck Topacio, Buck Platino, INTA Cariló e INTA Facón) cultivados por cuadruplicado en 2 épocas de siembra (Primera: junio a enero, Segunda: julio a enero), que sumaron un total de 224 muestras.

A continuación, se indican algunas de las características agroclimáticas de las localidades evaluadas en la presente investigación (Tabla 1):

**Tabla 1.** Condiciones agroclimáticas

Localidad	Tipo de clima	Condiciones Agroclimáticas	
		Temperatura media anual (°C)	Precipitación anual (mm)
Balcarce	Cfb	13,9	817
La Dulce	Cfb	13,6	817
Miramar	Cfb	13,4	850
Cabildo	Cfa	14,5	661

Fuente: Climate-Data.org

Las precipitaciones (mm) en las localidades evaluadas (Tabla 2), desde la siembra hasta la cosecha, en la campaña 2012/13 fueron las siguientes:



**Tabla 2.** Precipitaciones por localidad (mm)

Mes	Localidad			
	Balcarce	La Dulce	Miramar	Cabildo
Junio	12,0	45,3	25,5	2,8
Julio	5,6	51,2	11,0	0,0
Agosto	253,6	57,3	229,0	98,5
Septiembre	61,2	56,6	42,0	37,5
Octubre	50,6	84,0	75,0	122,5
Noviembre	63,8	85,9	64,0	77,0
Diciembre	239,3	71,7	156,0	147,5
<b>TOTAL</b>	686,1	452,0	602,5	485,8

Fuente: Larsen y Jensen, 2013

### **2.1. Caracterización del material biológico, identificación taxonómica y mantenimiento de los aislamientos**

Para la obtención de los aislamientos, se homogeneizó el material de cada una de las muestras al mezclar las repeticiones. Se obtuvieron de esta manera 56 muestras, cada una correspondiente a una combinación localidad-cultivar-fecha de siembra. De cada una de ellas se seleccionaron al azar 100 granos, incluyendo sintomáticos y asintomáticos, con los que se procedió al aislamiento de las especies de *Fusarium*. Se pusieron a prueba dos metodologías con la finalidad de conocer si la desinfección de los granos influía en la obtención de colonias del género:

- i) Desinfección de los granos por inmersión en alcohol de 70°, durante 1 min y en hipoclorito de sodio (0,275 g Cl L<sup>-1</sup>), durante 1 min; lavado en agua destilada estéril durante 5 min. La siembra se realizó en placas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG) al 2% (p/v) y con 0,25% (p/v) de cloranfenicol; y,
- ii) Sin desinfección superficial, la siembra de los granos se realizó en medio de cultivo APG al 2% (p/v) con 0,6% (p/v) de pentacloronitrobenceno (PCNB polvo mojable al 75%) y 0,25% (p/v) de cloranfenicol.

Las muestras se incubaron a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 5 d. Después de este tiempo se determinó el porcentaje de germinación. Dentro de los granos no germinados se seleccionaron los que mostraron presencia de *Fusarium* spp. y las colonias obtenidas a partir de ellos fueron repicadas a tubos de ensayo con medio APG al 2% (p/v) en pico de flauta, para efectuar posteriormente la identificación taxonómica.

De los aislamientos repicados se obtuvieron cultivos monospóricos. Para ello, porciones de las colonias se transfirieron a viales de 25 mL conteniendo 6 mL del medio de cultivo líquido de Cappellini y Peterson (1965), que fueron incubados a  $25^\circ\text{C}$  en agitación constante a  $150 \text{ rev min}^{-1}$  por 2 d. Transcurrido dicho tiempo se verificó la presencia de esporas en el medio de cultivo con ayuda del microscopio y un hematócitometro. Alícuotas de entre 0,5 y  $2 \mu\text{L}$  de los cultivos esporulados se incubaron en medio de cultivo agar agua al 2% por 48 h a  $25^\circ\text{C}$ . Las colonias individuales obtenidas se transfirieron a cajas de Petri con medio APG para su posterior identificación. El mantenimiento de los aislamientos monospóricos se llevó a cabo en viales con vaselina y con agua destilada estéril a  $4^\circ\text{C}$  (Buell y Weston, 1947).

Para la identificación taxonómica se utilizaron criterios morfológicos, biométricos y culturales. Los aislamientos se sembraron en APG al 2% (p/v) y en medio agar hojas de clavel (AHC), se incubaron a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 a 14 d y se identificaron de acuerdo con la densidad y pigmentación del micelio aéreo, la tasa de crecimiento, la producción de peritecios y la ontogenia conídica de acuerdo con los criterios de Leslie y Summerell (2006).

## **2.2. Identificación taxonómica mediante herramientas de biología molecular**

La identidad de los aislamientos obtenidos se comprobó mediante el uso de marcadores moleculares específicos para cada especie.

Para la extracción de ADN, los aislamientos provenientes de la colección conformada y mantenida a  $4^\circ\text{C}$  en agua/vaselina se sembraron en placas de Petri que contenían medio de cultivo APG al 2% (p/v) con 0,25% (p/v) de cloranfenicol. Las placas sembradas fueron incubadas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 d.

El ADN genómico se obtuvo de acuerdo con la metodología descrita por Aljanabi y Martínez (1997). En un mortero se molieron aproximadamente 250 mg de micelio con

200  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,4 M NaCl y 2 mM EDTA). El macerado se trasvasó a un microtubo de 1,5 mL que contenía 200  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción. A continuación, se añadieron a la mezcla 80  $\mu\text{L}$  de solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% y 20  $\mu\text{L}$  de Pronasa (20 mg  $\text{L}^{-1}$ ) y se incubó a 65°C durante 1 h. Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de una solución 4 M de NaCl, se mezcló en agitador Vortex durante 30 s a velocidad máxima y se centrifugó el tubo durante 20 min a 15.000 g. Luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 y se centrifugó durante 5 min a 13.000 g. El sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo y se adicionó un volumen de isopropanol, se homogeneizó invirtiendo el microtubo y se incubó a -20°C durante 12 h. El ADN precipitado se centrifugó durante 15 min a 15.000 g, el pellet se lavó con 100  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se centrifugó durante 5 min. Luego de secar el pellet se lo resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril.

La cantidad y calidad del ADN extraído se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, al que se le adicionaron 0,2 mg  $\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001). La corrida electroforética se realizó a 80 V en tampón trisborato-EDTA. Los fragmentos de ADN se visualizaron bajo luz UV y el ADN se cuantificó por comparación con las bandas generadas por el marcador molecular Lambda DNA/Hind III (Fermentas, USA).

Para la realización de las reacciones de PCR específicas de las especies de *Fusarium* se utilizaron distintos cebadores (Tabla 3).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en volúmenes de 20  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción contenía de 12-15 ng de ADN, 200  $\mu\text{M}$  de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,5  $\mu\text{M}$  de cada uno de los cebadores (FAGOS/Ruralex, Argentina), 1 U de *Taq* polimerasa (Highway Molecular Biology-InBio-UNICEN-Tandil), 1,5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  en tampón de reacción (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 1% Triton X-100).

El termociclador (PTC-150 MiniCycler™- M.J. Research, INC., USA) se programó según la especie a identificar. Para *F. graminearum* y *F. culmorum*, el proceso consistió en un ciclo de desnaturalización (95°C) por 3 min, seguido por 38 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 62°C por 20 s y extensión a 72°C por

45 s, se finalizó con un paso de extensión (72°C) durante 5 min. En el caso de *F. pseudograminearum*, consistió en un ciclo de desnaturalización (94°C) por 3 min, seguido por 38 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación a 55°C por 30 s y extensión a 72°C por 90 s, se finalizó con un paso de extensión (72°C) durante 3 min. Para *F. cerealis* y *F. sambucinum*, por su parte se utilizó un programa consistente en un ciclo de desnaturalización (94°C) por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 60°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, se finalizó con un paso de extensión (72°C) durante 3 min. Hasta su recuperación todas las reacciones fueron mantenidas a 15°C.

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para la identificación por PCR de las especies de *Fusarium* y su secuencia.

Especie	Cebador	Secuencia	Longitud	Autores
<i>F. graminearum</i>	Fg16NF	(5' - ACA GAT GAC AAG ATT CAG CGA CA - 3')	280 pb	Nicholson <i>et al.</i> (1998) y modificado por Malbrán <i>et al.</i> (2012)
	Fg16NR	(5' - TTC TTT GAC ATC TGT TCA ACC CA - 3')		
<i>F. culmorum</i>	Fc01F	(5' - ATG GTG AAC TCG TCG TGG C - 3')	570 pb	Nicholson <i>et al.</i> (1998)
	Fc01R	(5' - CCC TTC TTA CGC CAA TCT CG - 3')		
<i>F. pseudograminearum</i>	Fp1-1	(5' - CGG GGT AGT TTC ACA TTT CCG - 3')	523 pb	Aoki y O'Donnell (1999)
	Fp1-2	(5' - GAG AAT GTG ATG ACG ACA ATA - 3')		
<i>F. cerealis</i>	Cro-AF	(5' - CTC AGT GTC CAC CGC GTT GCG TAG - 3')	842 pb	Yoder y Christianson (1998)
	Cro-AR	(5' - CTC AGT GTC CCA ATC AAA TAG TCC - 3')		
<i>F. sambucinum</i>	Sam-EF	(5' - CAG AAG CGG AGC AAG TTC ACA ATC - 3')	312 pb	Yoder y Christianson (1998)
	Sam-ER	(5' - CAG AAG CGG ATG GAG ATG TAA AGT - 3')		

Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) que contenían 0,2 mg mL<sup>-1</sup> de bromuro de etidio. La corrida se realizó a 80 V en tampón Trisborato-EDTA. Los fragmentos de ADN se visualizaron bajo luz UV y su tamaño se estimó por comparación con las bandas generadas por un marcador molecular de ADN de 1 kb (Highway Molecular Biology- InBio- UNICEN-Tandil).

### 2.3. Análisis genómico de los quimiotipos de las especies de *Fusarium* vinculadas con la FET

El quimiotipo de los aislamientos identificados como pertenecientes a especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos del grupo B fue determinado mediante las metodologías de multiplex PCR desarrolladas por Starkey *et al.* (2007). Se utilizaron para ello los cebadores diseñados a partir de las secuencias de los genes que codifican para la síntesis de la 15-O-acetil-transferasa (TRI3) y de la bomba de eflujo (TRI12) (Alexander *et al.*, 1999), previamente validados por Ward *et al.*, (2002) (Tabla 4).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 µL. La mezcla de reacción contenía 12-15 ng de ADN, 200 µM de cada nucleótido, 0,5 µM de cada uno de los cebadores (FAGOS/Ruralex, Argentina), 0,5 U de Taq polimerasa (Highway Molecular Biology-InBio-UNICEN-Tandil), 1.5 mM Cl<sub>2</sub>Mg en tampón de reacción.

Se programó el termociclador (PTC-150 MiniCycler™- M.J. Research, INC., USA) para un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguida por 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s; hibridación a 52°C por 30 s; extensión a 72°C por 1 min; y, se finalizó con un paso de extensión a 72°C durante 3 min. Hasta su recuperación, la reacción fue mantenida a 15°C.

**Tabla 4.** Secuencias de cebadores utilizados para la detección de quimiotipos

Gen	Cebadores	Observaciones
TRI3	3CON (5' – TGG CAA AGA CTG GTT CAC - 3')	El cebador 3CON es común para todos los quimiotipos, mientras que los cebadores 3NA, 3D15A y 3D3A son específicos de cada quimiotipo. Tamaño de Amplicones: NIV 840 pb, 15-ADON 610 pb, 3-ADON 243 pb.
	3NA (5' – GTG CAC AGA ATA TAC GAG C - 3')	
	3D15A (5' – ACT GAC CCA AGC TGC CAT C - 3')	
	3D3A (5' – CGC ATT GGC TAA CAC ATG - 3')	
TRI12	12CON (5' – CAT GAG CAT GGT GAT GTC - 3')	El cebador 12CON es común para todos los quimiotipos, mientras que los cebadores 12NF, 12-15F y 12-3F son específicos de cada quimiotipo. Tamaño de Amplicones: NIV 840 pb, 15-ADON 670 pb, 3-ADON 410 pb
	12NF (5' – TCT CCT CGT TGT ATC TGG - 3')	
	12-15F (5' – TAC AGC GGT CGC AAC TTC - 3')	
	12-3F (5' – CTT TGG CAA GCC CGT GCA - 3')	

Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % (p/v), que contenían 0.2 mg mL<sup>-1</sup> de bromuro de etidio. La corrida se

realizó a 80 V en tampón Trisborato-EDTA. Los fragmentos de ADN se visualizaron bajo luz UV y sus tamaños se estimaron por comparación con las bandas generadas por un marcador molecular de ADN de 1 kb (Highway Molecular Biology- InBio- UNICEN- Tandil).

#### **2.4. Análisis estadístico**

Se recogieron datos de porcentaje de germinación de las semillas analizadas y especies fúngicas encontradas en cada muestra. Estos datos se relacionaron con la época de siembra y la localidad de procedencia de la muestra.

Los valores de porcentaje de germinación, velocidad de crecimiento micelial y frecuencia de aislamiento de especies de *Fusarium* se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

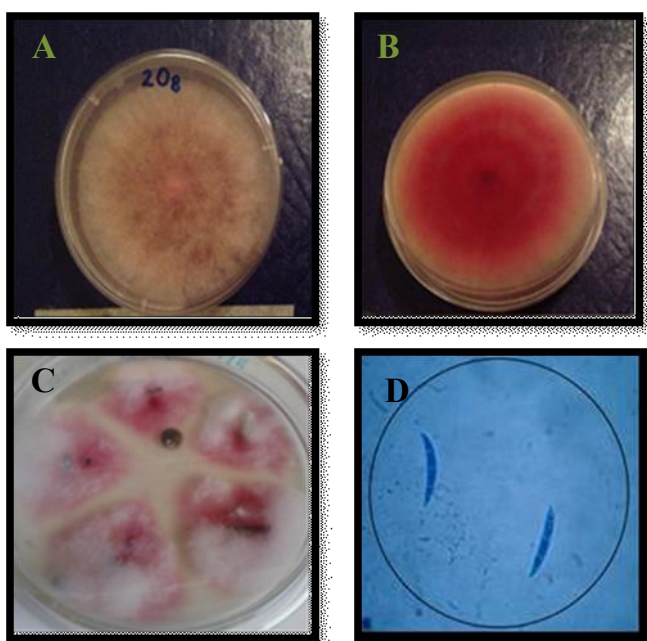
Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del programa informático Statgraphics v.16.1.03.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Aislamiento e identificación taxonómica

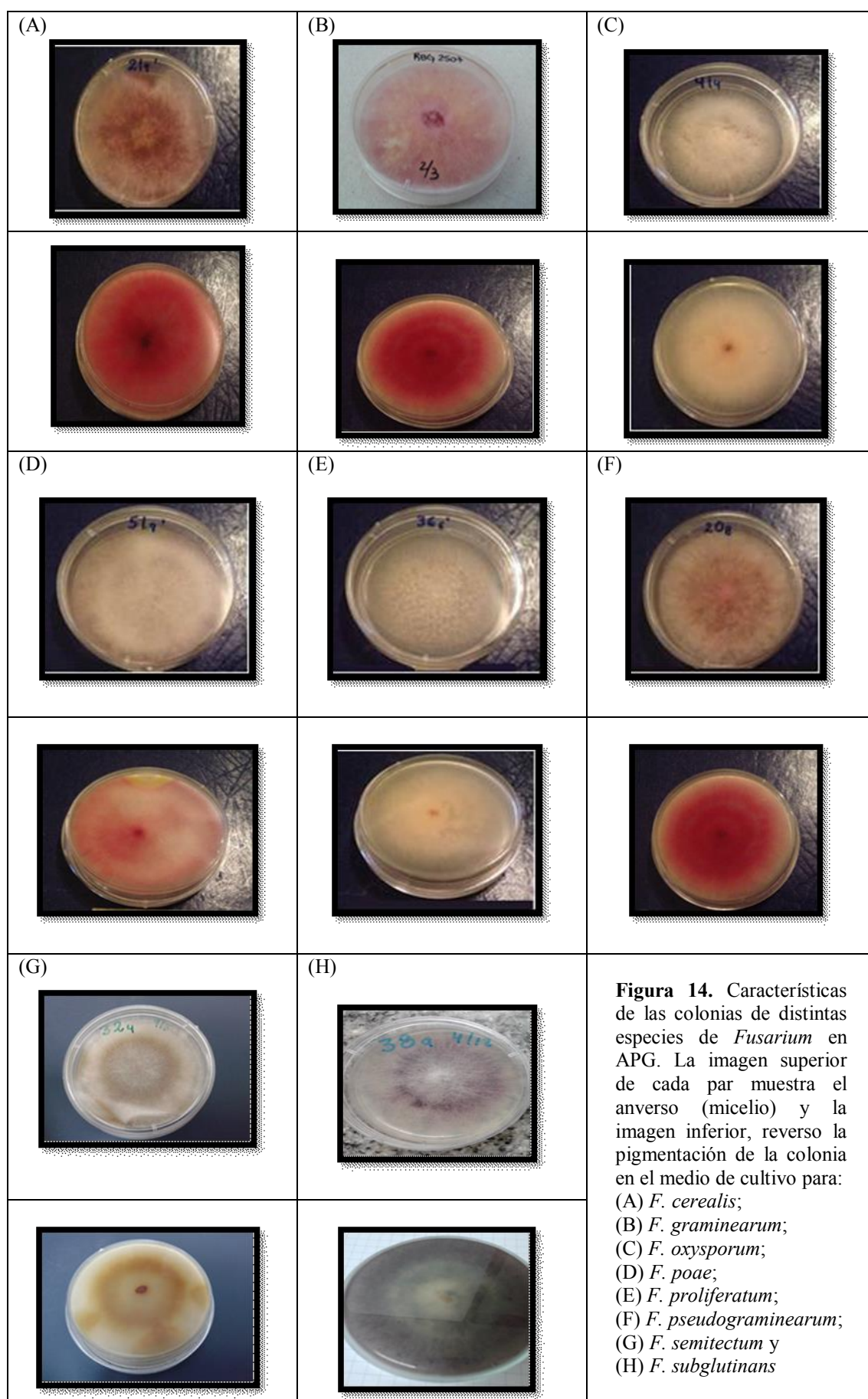
A partir de las muestras de trigo fideo se obtuvieron 169 aislamientos, que fueron identificados como pertenecientes a distintas especies del género *Fusarium* sobre la base de sus características culturales y biométricas, su morfología y su ontogenia conídica.

En los medios de cultivo APG y AHC se observaron diferencias tanto en las características culturales como morfológicas de las colonias obtenidas (Figura 13).



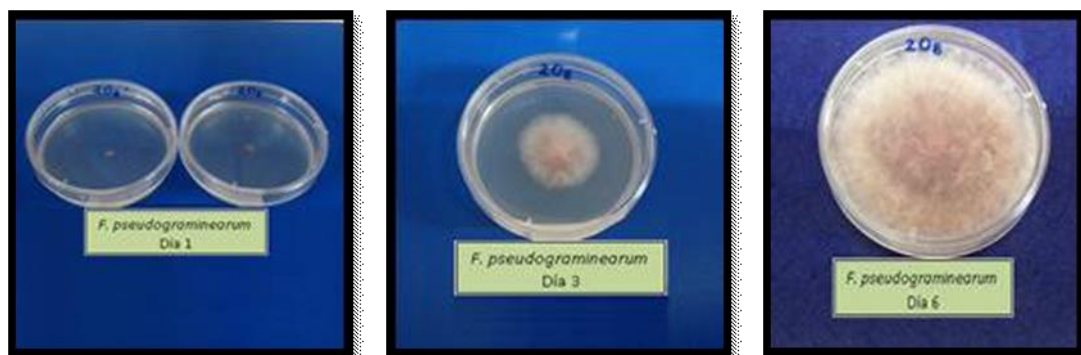
**Figura 13.** Identificación morfo-biométrica de los aislamientos. (A) coloración de micelio aéreo en agar papa glucosado (APG); (B) coloración de medio de cultivo agar papa glucosado (APG); (C) siembra en medio de cultivo agar hojas de clavel (AHC); (D) tamaño y forma de los macroconidios.

Al analizar los criterios morfo-biométricos y culturales para la identificación de las especies, se observó que la densidad del micelio y la pigmentación del medio de cultivo APG variaban según la especie (Figura 14).





Al evaluar la velocidad media de crecimiento (Figura 15 y Tabla 5), se encontró que los aislamientos de *F. cerealis* y *F. graminearum* tuvieron el crecimiento más rápido, completaron el diámetro de la placa de Petri 4 d después de la siembra; seguidos de las de *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, y *F. pseudograminearum*, que lo hicieron en 5 d; mientras que *F. semitectum* y *F. subglutinans*, lo hicieron en 6 d.



**Figura 15.** Crecimiento de una colonia de *F. pseudograminearum* en APG a distintos tiempos de incubación.

**Tabla 5.** Velocidad de crecimiento micelial según especie

Especie	Velocidad (mm/d) *
<i>F. cerealis</i>	16,60 <sup>a</sup>
<i>F. graminearum</i>	16,30 <sup>a</sup>
<i>F. oxysporum</i>	11,67 <sup>c</sup>
<i>F. poae</i>	14,27 <sup>b</sup>
<i>F. proliferatum</i>	13,10 <sup>bc</sup>
<i>F. pseudograminearum</i>	14,00 <sup>b</sup>
<i>F. semitectum</i>	9,97 <sup>d</sup>
<i>F. subglutinans</i>	13,43 <sup>b</sup>

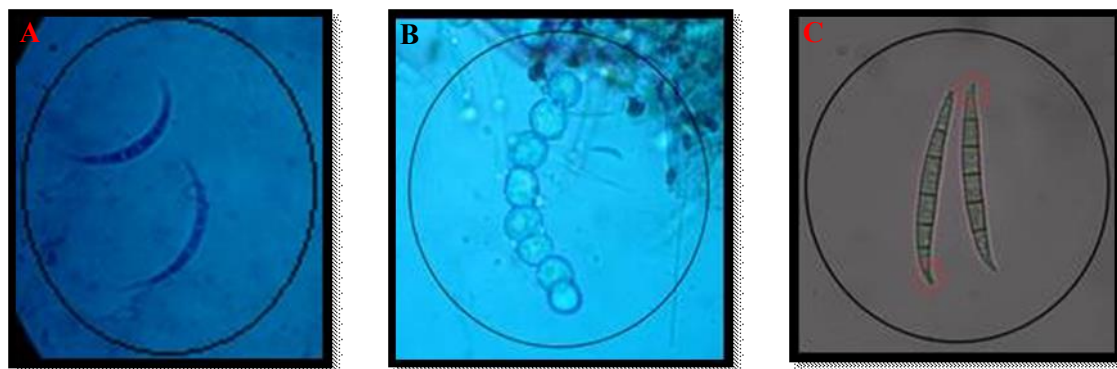
\* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

De acuerdo con el análisis estadístico ( $F = 49,64$ ;  $p < 0,01$ ), se observaron diferencias significativas entre las especies de *Fusarium* para la velocidad de crecimiento micelial. *F. cerealis* y *F. graminearum* presentaron las mayores velocidades medias de crecimiento, coincidiendo con Leslie y Summerell (2006) quienes mencionan que estas especies son de altas tasas de crecimiento micelial en APG.

A partir de la observación microscópica se establecieron las características morfológicas y biométricas de los conidios y de otras estructuras (forma, tamaño, número de septos, análisis de las células apicales y basales, presencia o ausencia de clamidosporas), así como las características culturales (forma, pigmentación, tasa de crecimiento o tipo de micelio) que permitieron determinar la identidad de las especies aisladas y efectuar una descripción de las mismas (Tabla 6 y Figura 16).

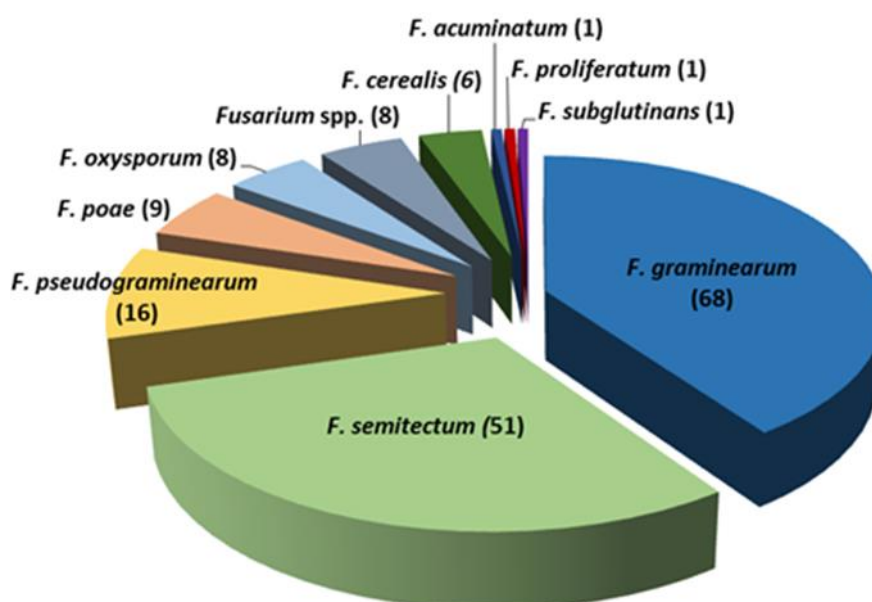
**Tabla 6.** Identificación morfo-biológica de las distintas especies de *Fusarium* aisladas de muestras de trigo fideo.

Especie	Características del micelio	Crecimiento	Conidios		Clamidospora	Número de septos	Célula apical	Célula basal
			Macroconidio	Microconidio				
<i>F. acuminatum</i>	micelio aéreo flooso de color blanco con pigmentación rosa.	Lento	Lado dorsal: curvatura moderada.	usualmente ausentes	presente (abundante)	~5	Forma curva alargada y estrecha.	Forma de pie no tan prominente.
<i>F. cerealis</i>	micelio blanco aéreo denso que con el tiempo se pone marrón. Reverso rojo carmín.	Rápido	Lado dorsal: curvatura pronunciada. Lado ventral: casi recto	ausentes	presente (abundante)	~5	Forma curva y estrecha en la punta.	Forma de pie pronunciada.
<i>F. graminearum</i>	micelio aéreo denso. Su color varía de blanco a naranja pálido. Reverso rojo carmín.	Rápido	Delgados de longitud mediana. Lado dorsal: arqueados Lado ventral moderadamente curvo	ausentes	presente (abundante)	~5 - 6	Forma cónica	Forma de pie desarrollada.
<i>F. oxysporum</i>	micelio algodonoso de color blanco. Revés melón o crema opaco.	Medio	Delgados de longitud pequeña a mediana. Rectos a ligeramente curvos.	presente (ovalados)	presente (abundante)	~3	Forma cónica - curvada.	Pie en forma de punta.
<i>F. poae</i>	micelio aéreo abundante de color blanco pálido que con el tiempo se torna marrón rojizo. Aroma frutal.	Rápido		presente (globosos, redondos)	presente (abundante)			
<i>F. proliferatum</i>	micelio aéreo, color inicial blanco con la edad es violeta o púrpura.	Medio		presente (se observan en cadenas características en mono y polifialides)	Ausente			
<i>F. pseudograminearum</i>	micelio abundante de color blanco a amarillo y rojo.	Medio	Delgados. Lado dorsal: curvatura moderada. Lado ventral: casi recto.	ausentes	presente (abundante)	~5 - 6	Forma curva	Forma de pie.
<i>F. semitectum</i>	micelio aéreo abundante y denso de color blanco que se torna baige o marrón	Lento		<b>Mesoconidios</b> se observan fácilmente al microscopio. Parecen orejas de conejo.	presente (pero no es común)			
<i>F. subglutinans</i>	micelio abundante, al inicio de color blanco con la edad toma una coloración violeta.	lento		presentes (ovalados se producen en falsas cabezas de mono y polifialides)	Ausente			



**Figura 16.** (A) Macroconidios de *F. acuminatum*, (B) Clamidosporas de *F. poae* (C) Macroconidios de *F. graminearum* mostrando la forma característica de sus células apical y basal.

En total se identificaron 9 especies: *F. acuminatum*, *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. pseudograminearum*, *F. semitectum* y *F. subglutinans*. Sobre un total de 169 aislamientos, 8 no se pudieron identificar a nivel de especie, por lo que se designaron como *Fusarium* spp. (Figura 17).



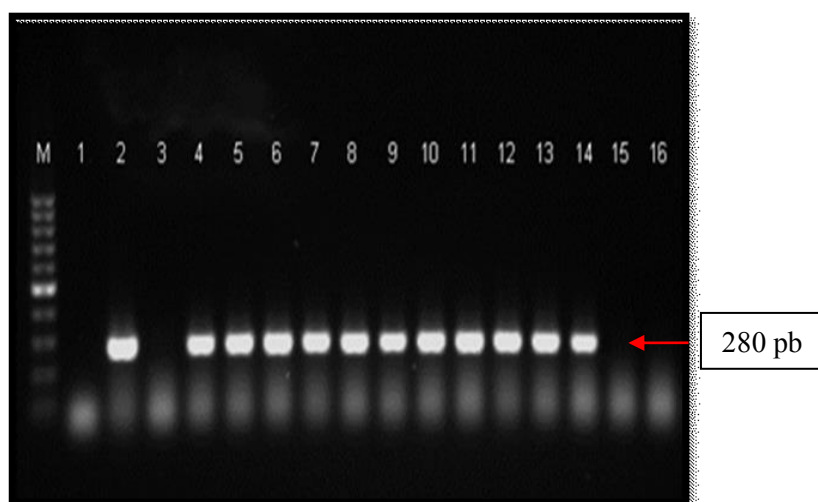
**Figura 17.** Distribución del número de aislamientos por cada especie del género *Fusarium* aislada durante el estudio

El elevado número de especies, la alta heterogeneidad y variabilidad de las especies del género *Fusarium* dificultan su identificación (Llorens *et al.*, 2006). Para la identificación de los aislamientos obtenidos en el presente estudio se tuvieron en cuenta

características culturales, morfológicas, biométricas y, fundamentalmente, el análisis de la ontogenia conídica de acuerdo con las claves descritas por Booth (1971) y Leslie y Summerell (2006).

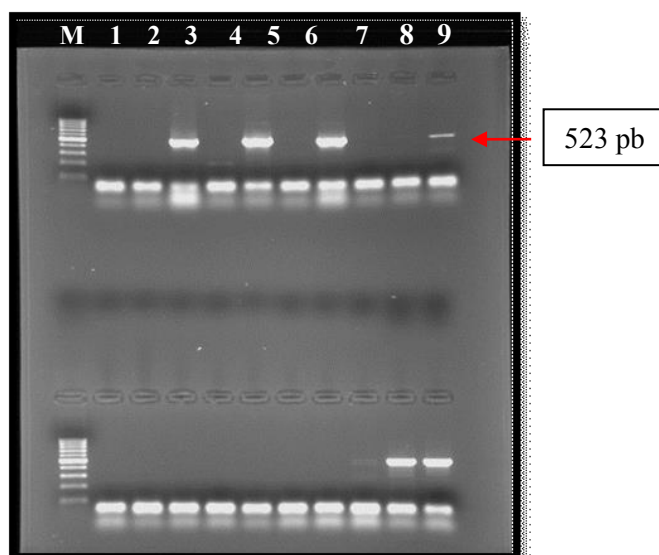
La confirmación de la identidad de las especies se realizó mediante herramientas moleculares únicamente para las especies mayormente citadas como causantes de la FET, tales como *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum* y *F. sambucinum*.

De los 169 aislamientos provenientes de las 4 localidades de la provincia de Buenos Aires, 98 fueron identificados como pertenecientes al complejo de especies de *F. graminearum* de acuerdo con sus características morfo-biométricas y culturales. Para 68 de estos aislamientos, la PCR específica de especie confirmó su identificación (Figura 18).

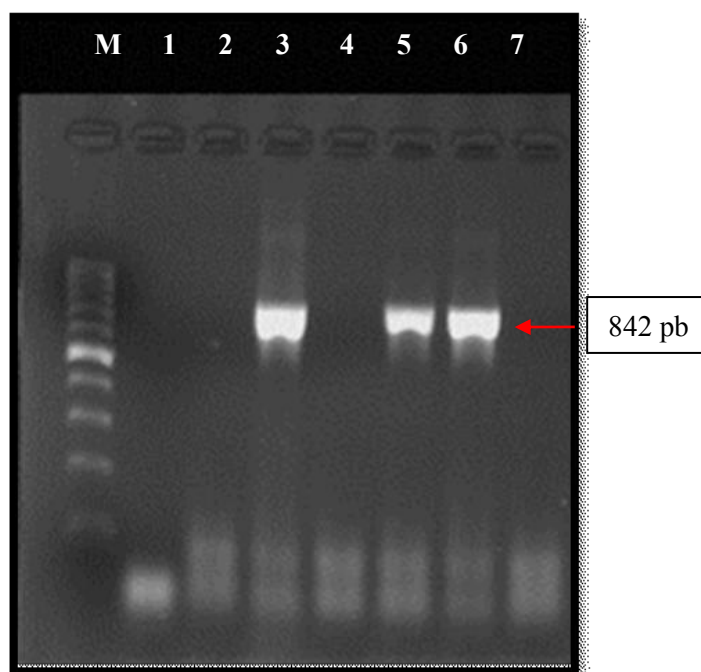


**Figura 18.** Gel de agarosa para la visualización del resultado de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de aislamientos de *Fusarium graminearum*, determinada por la presencia de un fragmento de 280 pb. La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1 000 pb, la calle 1 al control negativo sin ADN, la calle 2 al control positivo de *F. graminearum* (cepa RBG 2507) y las calles 3 – 22 a ADN de aislamientos de *Fusarium* spp.

De los 30 aislamientos restantes, las reacciones de PCR específicas de la especie determinaron que 16 pertenecían a *F. pseudograminearum* (Figura 19) y 6 a *F. cerealis* (Figura 20), mientras que los 8 restantes no pudieron ser identificados con la utilización de técnicas moleculares. Por otra parte, no se detectaron aislamientos pertenecientes a *F. culmorum* ni a *F. sambucinum* en los ensayos realizados.



**Figura 19.** Gel de agarosa para la visualización del resultado de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de aislamientos de *Fusarium pseudograminearum*, determinada por la presencia de un fragmento de 523 pb. La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1 000 pb, la calle 1 al control negativo sin ADN, la calle 2 al control negativo (*F. graminearum* cepa RBG 2507), la calle 3 al control positivo de *F. pseudograminearum* (cepa RBG 5229) y las calles 4 – 20 a ADN de aislamientos de *Fusarium* spp.



**Figura 20.** Gel de agarosa para la visualización del resultado de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de aislamientos de *Fusarium cerealis*, determinada por la presencia de un fragmento de 842 pb. La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1 000 pb, la calle 1 al control negativo sin ADN, la calle 2 al control negativo (*F. graminearum* cepa RBG 2507), la calle 3 al control positivo de *F. cerealis* (cepa RBG 999) y las calles 4 – 10 a ADN de aislamientos de *Fusarium* spp.

El análisis molecular permite complementar a la identificación morfológica, al proporcionar ensayos rápidos y fiables para la identificación rutinaria y clasificación de hongos patógenos de plantas (Abedi-Tizaki y Kazem, 2012).

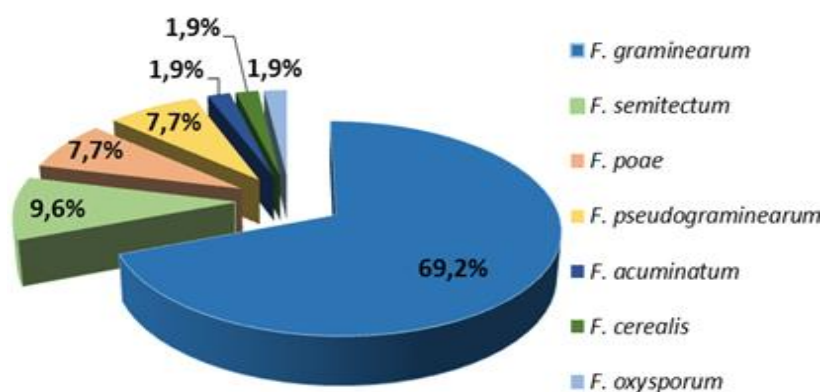
El hecho de que numerosas especies dentro del género *Fusarium* compartan características morfo-biométricas y culturales similares dificulta su correcta identificación. Un aporte significativo al respecto ha sido el desarrollo de reacciones de PCR utilizando cebadores específicos para cada especie, que complementan a la identificación morfo-biométrica en la identificación de las especies relevantes en el desarrollo de la Fusariosis de la espiga. Estos grupos de cebadores pueden ser utilizados, por ejemplo, para discriminar entre especies de características culturales similares como *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* y *F. sambucinum*, constituyéndose en una poderosa herramienta para la identificación.

Las especies del género *Fusarium* encontradas en cada muestra y su abundancia (valorada porcentualmente) difirieron entre las localidades muestreadas, la época de siembra y los cultivares analizados.

### 3.1.1. Análisis de la distribución de las especies por localidad

De las 9 especies de *Fusarium* halladas en muestras de trigo fideo, 4 de ellas *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. oxysporum* y *F. pseudograminearum* fueron identificadas en todas las localidades evaluadas. *Fusarium poae* fue aislada a partir de las muestras provenientes de Balcarce, La Dulce y Miramar, mientras que *F. cerealis* fue encontrado en Balcarce, Miramar y Cabildo. *F. acuminatum* se aisló únicamente de las muestras de Balcarce y *F. proliferatum* y *F. subglutinans* solo se hallaron colonizando granos provenientes de La Dulce (Figuras 21, 22, 23 y 24).

La abundancia relativa de cada una de las especies encontradas también varió entre localidades. En Balcarce, La Dulce y Miramar la especie más frecuentemente aislada fue *F. graminearum*, mientras que en Cabildo predominó la presencia de *F. semitectum*.



**Figura 21.** Frecuencia de especies de *Fusarium* aisladas de las muestras obtenidas de Balcarce.

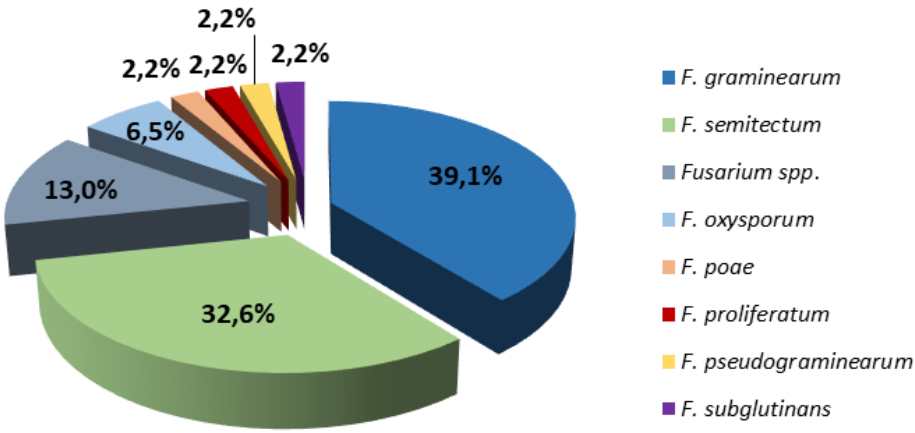


Figura 22. Frecuencia de especies de *Fusarium* aisladas de las muestras obtenidas de La Dulce.

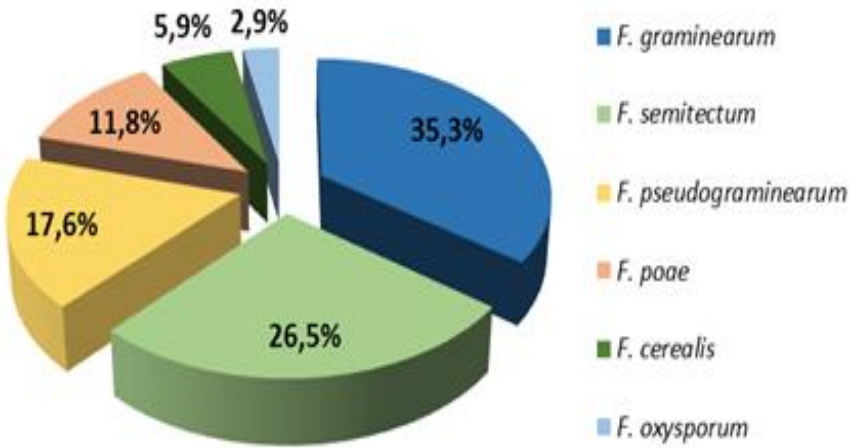


Figura 23. Frecuencia de especies de *Fusarium* aisladas de las muestras obtenidas de Miramar.

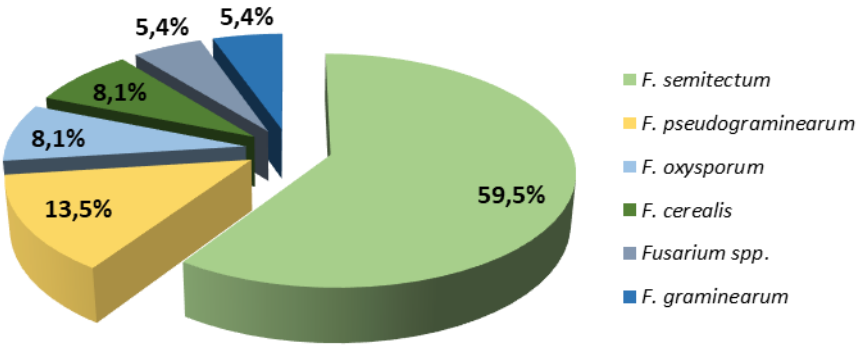
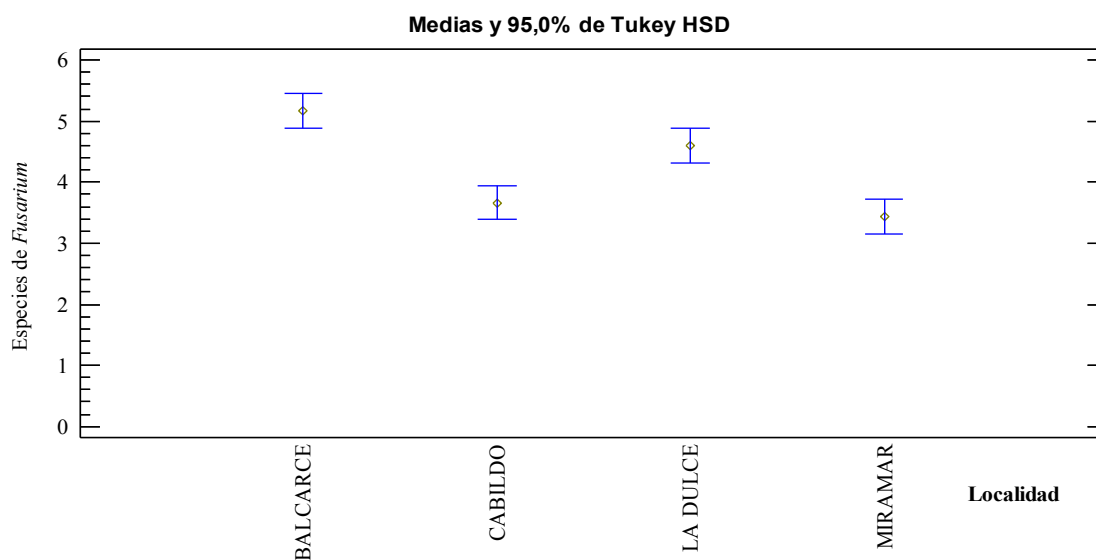


Figura 24. Frecuencia de especies de *Fusarium* aisladas de las muestras obtenidas de Cabildo.



El análisis estadístico aplicado demostró diferencias significativas entre la frecuencia de las especies de *Fusarium* encontradas ( $F = 584,31$ ;  $p < 0,01$ ), las especies aisladas de cada localidad ( $F = 28,76$ ;  $p < 0,01$ ) y la interacción entre ambos factores ( $F = 126,35$ ;  $p < 0,01$ ).

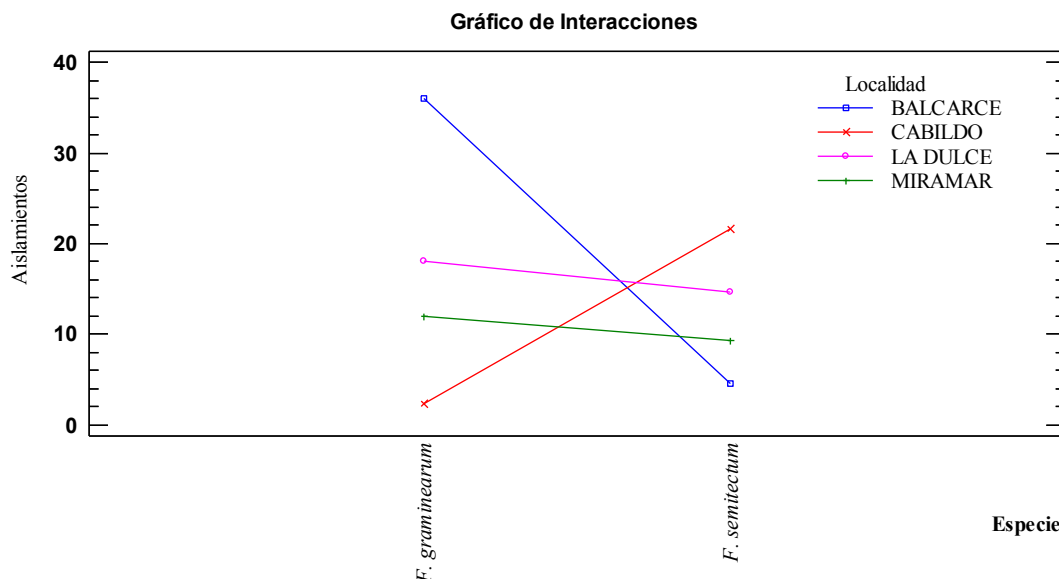
La abundancia de las especies de *Fusarium* aisladas dependió de la localidad considerada (Figura 25). De las muestras de Balcarce se aislaron significativamente más especies de *Fusarium* que del resto de las localidades, mientras que las localidades de Cabildo y Miramar presentaron la menor diversidad de especies del género.



**Figura 25.** Recuento de las especies de *Fusarium* aisladas en las localidades de estudio

Las interacciones entre las especies de mayor abundancia, *F. graminearum* y *F. semitectum*, con la localidad muestran la prevalencia de *F. graminearum* en Balcarce, mientras que en Cabildo la relación fue inversa (Figura 26). El comportamiento encontrado podría deberse a las condiciones agroclimáticas de cada localidad que favorecen el crecimiento y desarrollo de una o de otra especie. Se ha observado que tanto la temperatura como las precipitaciones influyen en la presencia o ausencia de una especie, Balcarce en promedio tiene una temperatura anual de 13,9°C y la precipitación anual es de 817 mm; mientras que en Cabildo la temperatura promedio anual es de 14,5°C y de precipitaciones 661 mm. La Dulce y Miramar, localidades que presentan condiciones agroclimáticas semejantes (temperaturas: 13,6 y 13,4°C; precipitaciones: 817 y 850 mm, respectivamente), mostraron frecuencias similares de aislamiento de ambas especies de *Fusarium*.



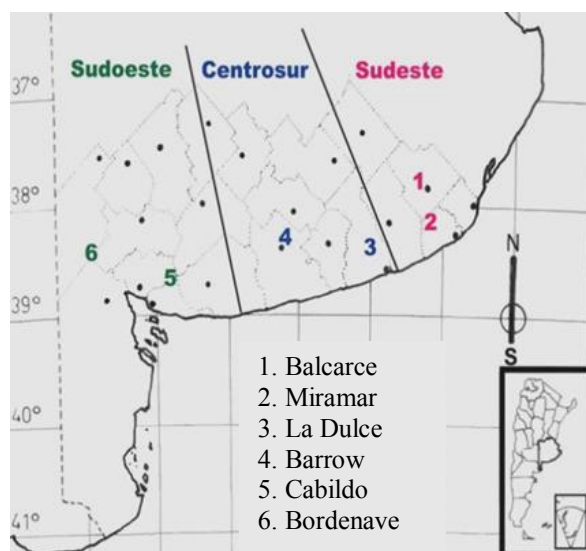


**Figura 26.** Interacciones entre las especies de *Fusarium* más frecuentemente aisladas y las localidades bajo estudio.

En un trabajo previo realizado a partir de muestras de trigo fideo provenientes del área productora de la Argentina, Lori y Sisterna (2001) citan la presencia de 7 especies del género *Fusarium* [*F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*., *F. pallidoroseum* (= *F. semitectum*) y *F. acuminatum*], identificadas mediante la caracterización morfo-biométrica y cultural. *Fusarium graminearum* fue la especie que se encontró con mayor frecuencia en las 5 localidades del estudio (Barrow, Balcarce, La Dulce, Miramar y Bordenave).

A diferencia del estudio mencionado precedentemente, en el presente estudio se identificaron 9 especies de *Fusarium* (*F. acuminatum*, *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. pseudograminearum*, *F. semitectum*, y *F. subglutinans*) mediante el empleo de herramientas micológicas convencionales y moleculares. Además de la mayor cantidad de especies aisladas en el presente trabajo, se destaca la coincidencia de 5 especies en ambos estudios: *F. acuminatum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae* y *F. semitectum* (= *F. pallidoroseum*). En cuanto a las especies diferentes, Lori y Sisterna (2001) encontraron a *F. equiseti* y *F. verticillioides*, mientras que en este trabajo se identificó a *F. cerealis*, *F. proliferatum*, *F. pseudograminearum* y *F. subglutinans*.

La mayor frecuencia encontrada para *F. graminearum* se relacionaría con las características agro-meteorológicas específicas de las campañas estudiadas. Moschini y Fortugno (1996), establecieron que las condiciones climáticas influyen desde el inicio del llenado al desarrollo temprano del grano y que la humedad relativa contribuye a la infección con *F. graminearum* y a la invasión fúngica de la espiga de trigo (Figura 27).



**Figura 27.** Ubicación geográfica de las localidades de la Provincia de Buenos Aires donde se produce trigo fideo. Tomado de Larsen y Jensen, 2013

En 1987, Love y Seitz mostraron que el crecimiento de *F. graminearum* se maximiza a valores de humedad relativa mayores a 92-94%, en concordancia con los modelos predictivos de la enfermedad en la Argentina propuestos por Moschini y Fortugno (1996) y Moschini *et al.* (2001), que correlacionaron la ocurrencia de epifitias y la presencia de fases de humedad relativa  $> 90\%$ , bajo temperaturas entre 15 y 30°C.

En la localidad de Balcarce, en la campaña 2012/13 se encontraron condiciones de alta humedad relativa y clima templado-cálido, durante la espigazón, la floración y el inicio de llenado del grano que favorecieron el desarrollo de *Fusarium* spp. (Bartosik *et al.*, 2012). La temperatura promedio desde la siembra hasta la cosecha (junio a enero-2013) fue de aproximadamente 14,01°C (Caballero, 2013) y el total de las precipitaciones, en estos meses, fue 686 mm (Larsen y Jensen, 2013)

Entre los patógenos débiles aislados de trigo han sido citados *F. poae*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. semitectum*, *F. verticillidies*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum*, *F. oxysporum* y *F. solani* (Lori *et al.*, 1992; de Galich, 1997). Estas especies

generalmente aparecen en aquellas campañas en las que las condiciones climáticas no favorecen la presencia de *F. graminearum*, principal agente causal de la FET en la Argentina (de Galich, 1997; Malbrán, 2013). En la presente investigación se obtuvieron aislamientos de *F. acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* en frecuencias mínimas, lo cual podría deberse a la mayoritaria predominancia de la especie más agresiva en la Argentina (Kikot *et al.*, 2011; Kikot, 2012).

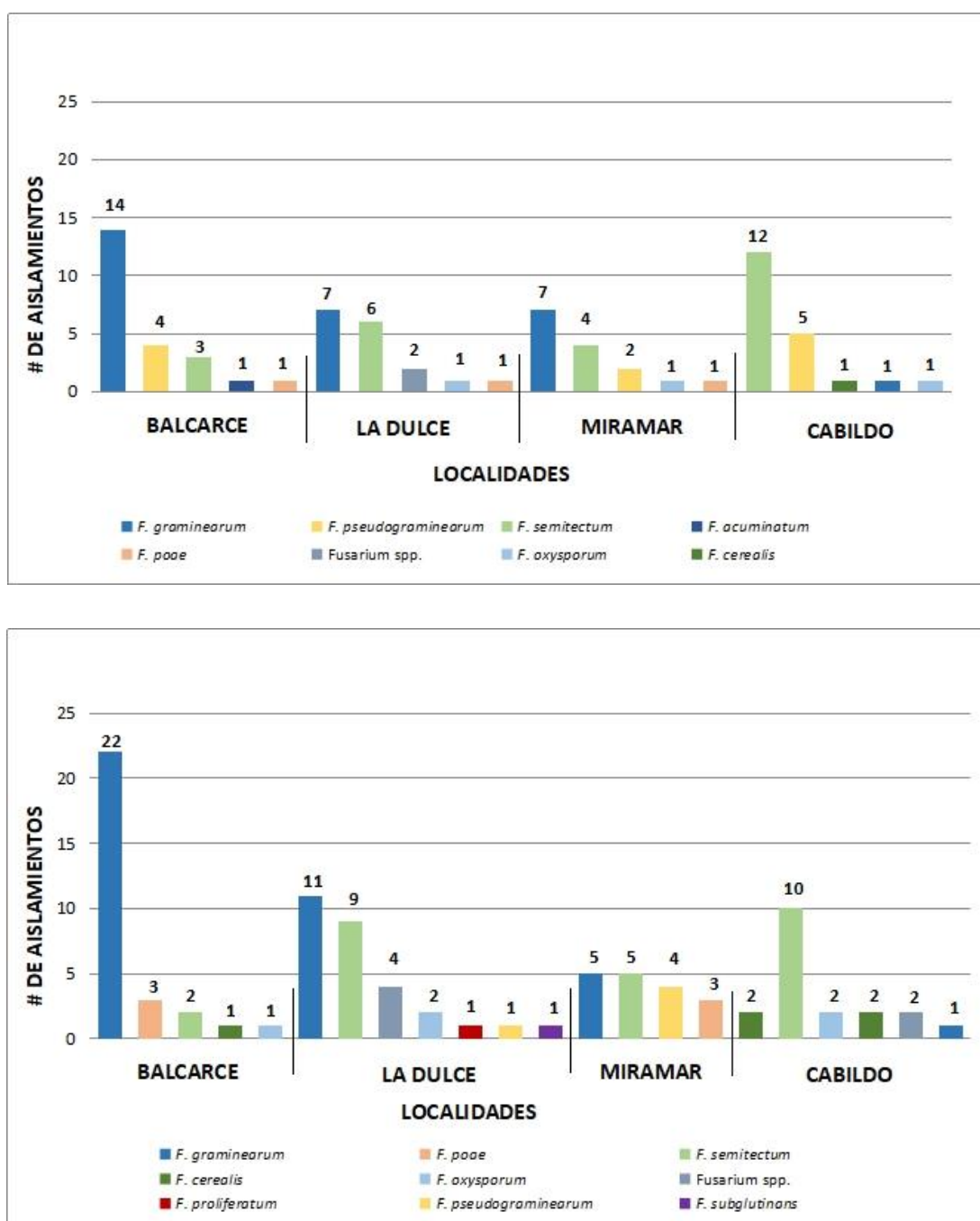
Consecuentemente, la presencia de *F. graminearum* predominó en 3 de las 4 localidades que se estudiaron (Balcarce, La Dulce y Miramar). Se detectó la presencia de *F. pseudograminearum* (16 aislamientos) y de *F. cerealis* (6 aislamientos), que también han tomado importancia como agentes causales de la FET por su capacidad toxicogénica y patogénica (Abramson *et al.*, 1993; Leslie y Summerell, 2006; Bottalico y Perrone, 2002).

*Fusarium semitectum*, especie considerada como patógeno débil, estuvo presente en las 4 localidades actualmente estudiadas, con predominio en Cabildo; mientras que en las otras regiones geográficas fue la segunda especie de mayor frecuencia. En estudios previos (Lori y Sisterna, 2001), esta especie también fue encontrada. Si bien esta especie no es considerada como un patógeno de gran importancia para el desarrollo de la FET, es necesario tener en cuenta que es capaz de producir micotoxinas tales como ZEA (Rojas *et al.*, 2015).

### **3.1.2. Especies aisladas en relación a la época de siembra**

Con respecto a las épocas de siembra (Figura 28), se observó que la mayoría de las especies identificadas estuvieron presentes en las 2 épocas de siembra (junio 2012 a enero 2013), en las 4 localidades.

Especies como *F. acuminatum*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* se encontraron en una sola época de siembra y estuvieron presentes con frecuencias mínimas.



**Figura 28.** Número de aislamientos de *Fusarium* aislados en las muestras obtenidas distintas épocas de siembra. (A) Primera época y (B) Segunda época.

En las localidades del sudeste de la Provincia de Buenos Aires, *F. graminearum* predominó en las dos épocas de siembra. En Cabildo, (localidad con condiciones agroclimáticas semiáridas/secas) fue evidente la predominancia de *F. semitectum* en las dos épocas de siembra. Esta especie es considerada un habitante común de las áreas áridas y semiáridas y su presencia en las distintas especies vegetales se ve facilitada por la capacidad de producir blastosporas (*dry spore*) que le permiten desplazarse con el

viento (Booth, 1971). La presencia de *F. poae* en Balcarce, de *F. oxysporum* en La Dulce, de *F. pseudograminearum* y de *F. poae* en Miramar y de *F. cerealis* y de *F. oxysporum* en Cabildo fue independiente de la época de siembra.

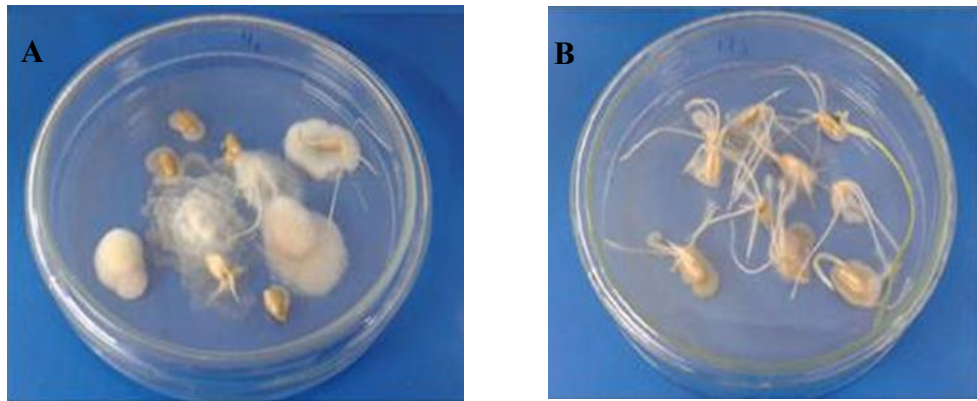
Las muestras de grano estudiadas procedieron de 7 cultivares: ACA 180, ACA190, Buck Granate, Buck Platino, Buck Topacio, INTA Cariló e INTA Facón. Tradicionalmente, en la Argentina los cultivares se han calificado como susceptibles a moderadamente susceptibles. De los cultivares evaluados en esta investigación, todos fueron afectados por la FET, con diferentes niveles, sin embargo, para evaluar el comportamiento de cada cultivar deberían tenerse en cuenta las diferentes condiciones agro-meteorológicas que se dieron durante el momento de la floración en cada una de las localidades de cultivo.

### **3.1.3. Efectos de las especies de *Fusarium* sobre la calidad del grano**

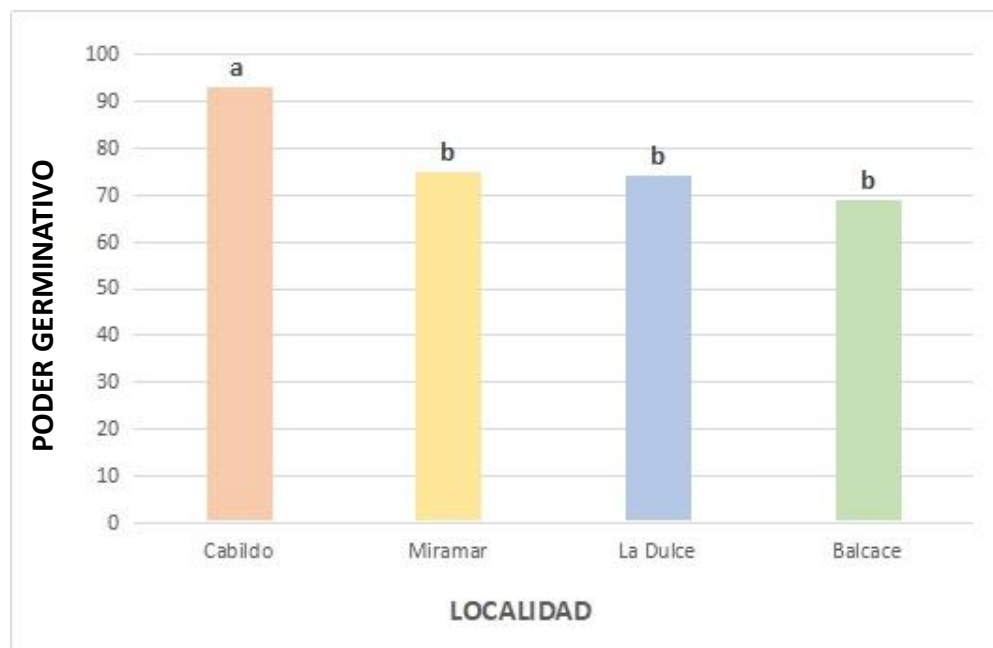
El poder germinativo de las semillas varió según la localidad de procedencia y, en consecuencia, según la especie de *Fusarium* predominante (Figuras 29 y 30).

Existieron diferencias significativas entre el poder germinativo de las semillas provenientes de Cabildo y el de las semillas del resto de las localidades muestreadas ( $F = 27,38$ ;  $p < 0,01$ ). Esto podría deberse a la mayor presencia de *F. graminearum* en las localidades de Balcarce (69,2%), La Dulce (39,1%) y Miramar (35,3%) con respecto a la localidad de Cabildo (5,4%), donde predominó la presencia de *F. semitectum*.

Estudios previos han relacionado la presencia de *F. graminearum* con la disminución de la calidad del grano, que afecta algunas características como rendimiento, PMG, PH y poder germinativo (Trigo-Stockli *et al.* 1998), mientras que *F. semitectum* no ha sido asociado con la disminución del poder germinativo (Leslie y Summerell, 2006).



**Figura 29.** Evaluación de la germinación de semillas de trigo fideo a los 7 d. (A) Balcarce y (B) Cabildo

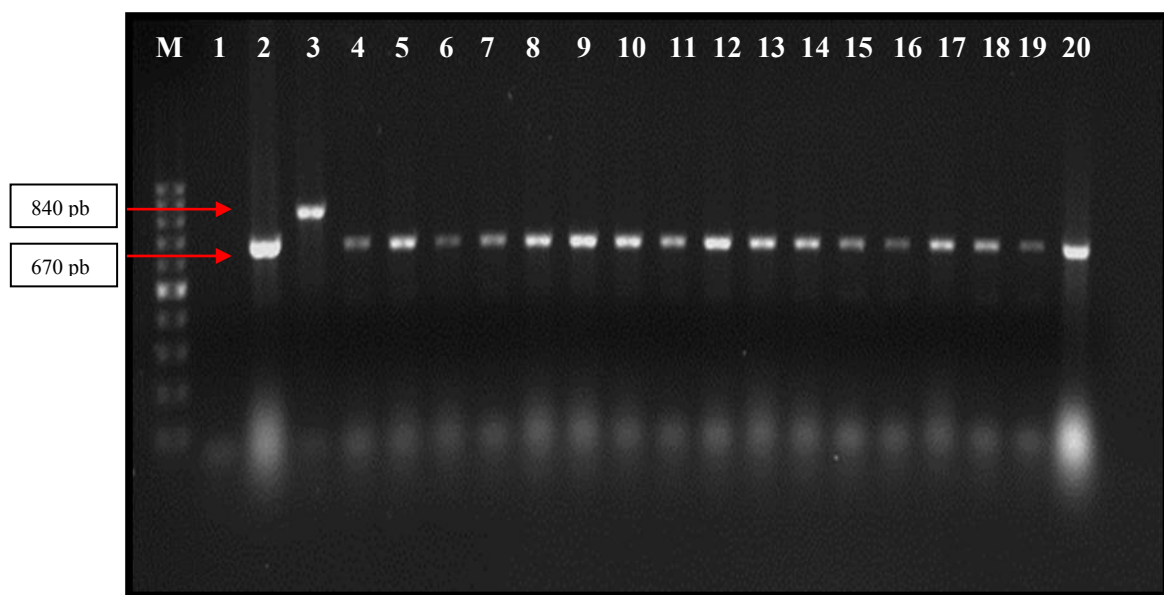


**Figura 30.** Poder germinativo por localidad. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3.2 Quimiotipos de las especies de *Fusarium* aisladas

Los resultados obtenidos con el conjunto de cebadores, cuyo objetivo es el gen *Tri12* resultaron mejores que los obtenidos con los cebadores desarrollados a partir del gen *Tri3*, por lo que solo se presentan los resultados obtenidos a partir de los primeros (Figura 31).

La totalidad de los aislamientos de *F. graminearum* analizados se identificaron como pertenecientes al quimiotipo 15-ADON mientras que los aislamientos de *F. pseudograminearum* y *F. cerealis* pertenecieron al quimiotipo NIV. Ocho cepas de *F. pseudograminearum*, no pudieron ser identificados en cuanto a su quimiotipo.



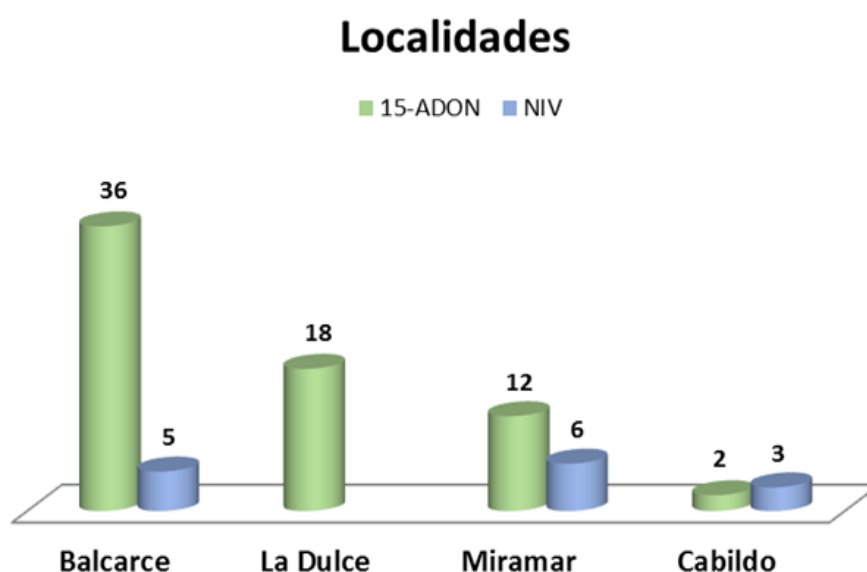
**Figura 31.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de los quimiotipos (Starkey *et al.*, 2007). La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1 000 pb., la calle 1 al control negativo (sin ADN), la calle 2 al control positivo 15-ADON (*F. graminearum* cepa RBG 2507), la calle 3 al control positivo NIV (*F. cerealis* cepa MR34) y de las calles 4 – 20 a muestras de ADN de *F. graminearum*, *F. pseudograminearum* y *F. cerealis*. Tamaño de los fragmentos 840 pb: NIV y 670 pb: 15-ADON.

Tanto Lori *et al.* (1992) como Fernández Pinto *et al.* (2008) encontraron cepas de *F. graminearum* obtenidas de trigo pan que presentaron la capacidad de producir NIV e incluso DON y NIV, en forma conjunta. Ramírez *et al.* (2006) encontraron que el 90% de los aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de muestras de trigo pan produjeron exclusivamente DON; mientras que el 10% restante produjo DON y 3-ADON. En el estudio realizado por Álvarez *et al.* (2011) hallaron quimiotipos NIV, FUSX, DON, 3-ADON, 15-ADON y ZEA a partir de 144 cepas de *F. graminearum sensu stricto*, provenientes de la principal área de producción de trigo pan, ubicada en la provincia de Buenos Aires (Zonas IIS, IV y VS), al este de la provincia de La Pampa (Zona VS) y al sur de la provincia de Santa Fe (Zona IIS).

En el caso de *F. graminearum*, los resultados concuerdan con los obtenidos por Lori *et al.* (2003), que evaluaron la presencia de *F. graminearum* y la contaminación consecuente con DON en el área de trigo fideo de la Argentina. Cabe destacar que en el presente trabajo no se realizó una determinación del contenido de los tricotecenos sino que se efectuó la caracterización de los quimiotipos. En otros trabajos se ha utilizado similar metodología molecular para la determinación de los quimiotipos (Ward *et al.*,

2002; Chandler *et al.*, 2003; Quarta *et al.*, 2005; Quarta *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Sampietro *et al.*, 2010; Yli-Mattila, 2010; Yli-Mattila y Gagkaeva, 2010; Reynoso *et al.*, 2011). Palacios *et al.*, en 2017 reportaron la presencia de cepas de *F. graminearum* con quimiotipo 15-ADON en 7 localidades de cultivo de trigo fideo, entre estas Balcarce, La Dulce, Miramar y Cabildo.

En la zona este de la región productiva (las localidades de Balcarce, La Dulce y Miramar), en las que se encontró la mayor cantidad de *F. graminearum*, se esperaría la ocurrencia de contaminación con DON y sus derivados acetilados en trigo fideo (Figura 32). En el oeste de la zona de producción de trigo fideo, por su parte, sería más probable un mayor riesgo de contaminación del grano con NIV debido a la presencia de otras especies de *Fusarium* productoras de este metabolito.



**Figura 32.** Caracterización de genotipos productores de tricotecenos de los aislamientos identificados como *Fusarium* spp. por localidad.

En trabajos previos (Lori *et al* 2003) se halló contaminación natural con DON en trigo fideo en 4 localidades, en los dos años de estudio. En el segundo año los niveles de DON fueron mayores con respecto al primero. En Balcarce y Miramar se encontraron valores medios superiores de contaminación. El valor más elevado se obtuvo en Balcarce, mientras que en Bordenave la ocurrencia de esta toxina fue nula. En 2017, Palacios *et al.*, encontraron que todas las cepas de *F. graminearum* presentaron genotipo DON/15-ADON en concordancia con el presente estudio en el que se encontraron que todos los aislamientos de esta especie fueron 15-ADON.



Con relación a la contaminación con DON, Hart *et al.* (1984) establecieron que la exposición de las espigas de trigo a la humedad aumentó la gravedad de la infección, así como la producción de DON. Por tal razón, los resultados obtenidos estarían relacionados con la humedad relativa y las precipitaciones que se presentaron en cada región. Balcarce, La Dulce y Miramar están situadas en una zona húmeda y por tal razón se observó mayor presencia de los quimiotipos relacionados con la micotoxina; mientras que, en Cabildo, por hallarse en un área agroecológica seca (68 % de humedad relativa durante el llenado de grano), no se vio favorecida la infección por *F. graminearum*, principal agente causal de la FET y productor de DON.

La información existente en el país sobre la presencia de *F. pseudograminearum* y la FET es escasa. En los últimos años ha sido citado como agente causal de esta enfermedad, aunque previamente esta especie se encontraba vinculada con la podredumbre de la corona (Tunali *et al.*, 2012; Monds *et al.*, 2005). Castañares *et al.* (2012) encontraron aislamientos de esta especie en granos de cebada y determinaron su potencial en la producción de DON y 3-ADON.

Por lo general, se considera que *F. pseudograminearum* es productora de DON, 3-ADON y ZEA (Blaney y Dodman, 2002). Sin embargo, en el presente estudio se obtuvieron aislamientos productores pertenecientes al quimiotipo NIV, en coincidencia con los resultados de Monds *et al.* (2005) que reportaron algunas cepas con la capacidad de producir NIV en muestras procedentes de trigo de Nueva Zelanda; y, Clear *et al.* (2006), que obtuvieron entre sus aislamientos uno con la capacidad productora de esta micotoxina.

La especie *F. cerealis* también está considerada como agente causal de la FET (Chandler *et al.*, 2003) se conoce que es un hongo cosmopolita que se encuentra en distintas áreas, generalmente de lluvias moderadas (Burgess *et al.*, 1982), y en la Argentina se la ha reportado asociada al trigo (Álvarez *et al.*, 2011) y a la cebada (Castañares *et al.*, 2013). Palacios *et al.*, 2017 en un estudio reciente sobre trigo fideo encontraron *F. cerealis* productora de quimiotipo NIV, coincidentemente con lo reportado en el presente trabajo. Otros autores como Sugiura *et al.*, (1993) y Bottalico, (1998) también han indicado que esta especie produciría esta micotoxina.

En la investigación realizada por Sugiura *et al.* (1993), en Hokkaido – Japón, se analizaron muestras de trigo y se encontraron 4 aislamientos de *F. cerealis*, que produjeron NIV. Bottalico (1998), en su trabajo sobre enfermedades de cereales que se realizó en distintas áreas geográficas de Europa, mencionó que a partir de muestras de trigo y de otros cereales menores se obtuvieron cepas de *F. cerealis* productores de NIV. Similares resultados fueron obtenidos por otros autores (Chandler *et al.*, 2003; Yli-Mattila y Gagkaeva, 2010).

Algunos estudios realizados sobre el efecto de NIV en el metabolismo y la proliferación celular indicarían que el consumo de esta toxina es más tóxico para los seres humanos y animales que el DON (Minervini *et al.*, 2004; Luongo *et al.*, 2008). Por lo tanto, al haberse detectado mediante este estudio la presencia de aislamientos de *F. pseudograminearum* y *F. cerealis* correspondientes al quimiotipo NIV en la zona productora de trigo fideo, existe la necesidad de tomar medidas preventivas y oportunas, dado el potencial riesgo de contaminación de granos con esta micotoxina.

## 4. CONCLUSIONES GENERALES

### 4.1. Contexto de la problemática

En el presente trabajo se obtuvieron 169 aislamientos de diferentes especies del género *Fusarium* a partir de muestras de granos de trigo fideo procedentes de 4 localidades (Balcarce, la Dulce, Miramar y Cabildo), ubicadas en el sudeste y sudoeste de la Provincia de Buenos Aires. La identificación taxonómica se realizó según las características morfo-fisiológicas, culturales y al análisis de la ontogenia conídica de los aislamientos. La confirmación de las especies de interés para la FET (*F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* y *F. sambucinum*) se realizó mediante el uso de PCR, con cebadores específicos de las especies. Con estos resultados se cumplieron los objetivos de ***Analizar la composición de la micobiota asociada con la FET en distintas localidades de producción de trigo fideo e Identificar a nivel de especie los aislamientos obtenidos con el empleo de criterios morfológicos, biométricos y moleculares.***

Las muestras procedentes de las localidades de Balcarce, La Dulce y Miramar, zonas en las que predominó *F. graminearum* entre las especies aisladas, mostraron menor poder germinativo que las muestras de Cabildo donde la especie más frecuentemente aislada fue *F. semitectum*. Con estos datos se alcanzó parcialmente el objetivo de ***Determinar el efecto de la micobiota presente sobre la calidad de la semilla.***

Los aislamientos identificados como *F. graminearum*, *F. pseudograminearum* y *F. cerealis*, productores de tricotecenos, se caracterizaron según sus quimiotipos. Para lo que se utilizó una multiplex PCR. Se encontraron aislamientos pertenecientes a los quimiotipos 15-ADON y NIV. Todos los aislamientos de *F. graminearum* fueron productores de 15-ADON. El quimiotipo NIV fue obtenido en las cepas de *F. pseudograminearum* y *F. cerealis*, en el país no hay información que vincule a *F. pseudograminearum* con ese quimiotipo en trigo fideo. De esta manera se cumplió con el objetivo ***Estimar la potencialidad de contaminación con micotoxinas de los granos producidos en cada área.***

## 4.2. Conclusiones finales

- i. A partir de las características morfo-fisiológicas y moleculares de los 169 aislamientos obtenidos del género *Fusarium*, se identificaron 161 aislamientos: *F. acuminatum* (1), *F. cerealis* (6), *F. graminearum* (68), *F. oxysporum* (8), *F. poae* (9), *F. proliferatum* (1), *F. pseudograminearum* (16), *F. semitectum* (51) y *F. subglutinans* (1). Los 8 aislamientos restantes no pudieron ser identificados a nivel de especie.
- ii. Se encontró la presencia mayoritaria de *F. graminearum sensu stricto* (68), considerado como el principal agente causal de la FET en la Argentina, además de otras especies de interés que actualmente están tomando relevancia dentro de la enfermedad, como *F. cerealis* (6) y *F. pseudograminearum* (16).
- iii. El hecho de que en las localidades del sudeste (Balcarce, La Dulce y Miramar), hubo predominancia de *F. graminearum* (68); mientras que, en Cabildo, localidad del sudoeste, hubo mayor frecuencia de *F. semitectum* (51), evidencia el efecto de las distintas condiciones agroclimáticas existentes en las áreas estudiadas sobre la micobiota asociada a la FET.
- iv. Las semillas procedentes de Cabildo mostraron el mejor porcentaje de germinación (93%), en relación con las procedentes de las otras tres localidades, en las cuales el porcentaje de germinación fue menor al 80%.
- v. El quimiotipo 15-ADON fue obtenido con mayor frecuencia, resultado directamente relacionado con la presencia de *F. graminearum*, especie predominante en este estudio.

Sobre la base de los resultados obtenidos no se rechaza la hipótesis planteada: **“Condiciones agro-climáticas como las del Este y las del Oeste de la Provincia de Buenos Aires generan diferencias cuantitativas en la composición de la micobiota causante de la fusariosis de la espiga en trigo fideo, que determinan la potencialidad de contaminación de los granos con micotoxinas”.**

#### 4.3. Interrogantes surgidos a partir del presente estudio

A continuación, se indican algunos interrogantes derivados del presente trabajo, que podrían complementar la información que aporta el mismo.

- i. El trabajo se realizó en las localidades de Balcarce, La Dulce, Miramar y Cabildo; sin embargo, dentro de las localidades en las que se cultiva trigo fideo también están Barrow y Bordenave, por lo que un análisis global de las 6 localidades aportaría información más completa.
- ii. Debido a que *F. cerealis* y *F. pseudograminearum* son especies de importancia sería necesario evaluar su capacidad de infectar espigas de trigo e inducir los síntomas de la FET (prueba de patogenicidad). De igual manera, sería significativo identificar sus quimiotipos y el tipo de toxinas producidas por estos aislamientos *in vivo*, para así confirmar los resultados obtenidos en esta investigación.
- iii. Debido a que las otras especies de *Fusarium* asociadas al trigo fideo producen micotoxinas que pueden perjudicar a la salud humana y animal, se deberían caracterizar de manera más completa, a pesar de que fueron encontradas con menor frecuencia o son consideradas como “patógenos débiles”.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Abedi-Tizaki, M. y Kazem, S. 2012. Morphological and molecular identification of *Fusarium* head blight isolates from wheat in north of Iran. *Australian Journal of Crop Science*, 6(9):1356-1361.
- Abramson, D., Clear, R.M. y Smith, D.M. 1993. Trichothecene production by *Fusarium* spp. isolated from Manitoba grain. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 15: 147-152.
- Aguilar, X. 2013. Caracterización morfoagronómica de 21 accesiones de trigo duro (*Triticum turgidum* l. (thell) *durum*) en la localidad de Laguacoto II, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar. Disponible en: <http://www.biblioteca.ueb.edu.ec>
- Akande, K.E., Abubakar, M.M., Adegbola, T.A. y Bogoro, S.E. 2006. Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(5): 398-403.
- Alberione, E. et al. 2013. Problemas con fusariosis de la espiga en trigo en la Campaña 2012/13. Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/problemas-con-fusariosis-de-la-espiga-en-trigo-en-la-campana-2012-13/>
- Alconada Magliano, T.M. y Chulze, S.N. (eds.) 2013. *Fusarium Head Blight in Latin America*. Dordrecht, Holanda. Springer.
- Alexander, N.J., Hohn, T.M. y McCormick, S.P. 1998. The TRI11 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:221-225.
- Alexander, N.J., McCormick, S.P. y Hohn, T.M. 1999. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Molecular and General Genetics*. 261:977-984.
- Aljanabi, S.M. y Martínez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. 25: 4692-4693.
- Álvarez, C., Somma, S., Proctor, R., Stea, G., Mulé, G., Logrieco, A., Fernández Pinto, V. y Moretti, A. 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins*. 3: 1294-1309.

- Annone, J.G., Botta G. y Ivancovich, A. 1994. Ocurrencia de la mancha bronceada del trigo en el área norte de la provincia de Buenos Aires. Actas del II Congreso Nacional de Trigo y 1er. Simposio Nacional de Cereales de Invierno. pp. 205-208.
- Aoki, T. y O'Donnell, K. 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. Nov., formerly recognized as the group 1 population of *F. graminearum*. Mycologia. 91: 597–609.
- Appelgren, L.E., Arora, R.G. y Larsson, P. 1982. Autoradiographic studies of [3H] zearalenone in mice. Toxicology. 25: 243–53.
- Arias, M. *et al.* 1996. Guía de recomendaciones de control o manejo integrado de problemas fitosanitarios en cultivos tropicales de importancia económica. INIAP-Estación experimental Pichilingue. Departamento Nacional de Protección Vegetal. Quevedo, Ecuador. Disponible en <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1694/1/Guia%20de%20recomendaciones%20de%20control.pdf>
- Atanda, O., Makun, H., Ogara, I., Edema, M., Idahor, K., Eshiett, M. y Oluwabamiwo, B. 2013. Fungal and Mycotoxin Contamination of Nigerian Foods and Feeds. En: H. A. Makun (Ed.). Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries. pp. 3–38.
- Bai, G-H. *et al.* 2001. Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. Plant Breeding. 120: 1–6.
- Balajee, S.A., Borman, A.M., Brandt, M.E., Cano, J., Cuenca-Estrella, M., Dannaoui, E., Guarro, J., Haase, G., Kibbler, C.C., Meyer, W., O'Donnell, K., Petti, C.A., Rodriguez-Tudela, J.L., Sutton, D., Velegraki, A. y Wickes, B.L. 2009. Sequence-Based Identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and Mucorales species in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here? Journal of Clinical Microbiology. 47(4): 877–884.
- Bartosik, R., Castellari, C., Cardoso, L., de la Torre, D., Abadía, B., Carpaneto, B. y Valle, F. 2012. Manejo de trigo con Fusariosis en la poscosecha. Unidad Integrada Balcarce INTA-FCA. Disponible en <https://inta.gob.ar/documentos/manejo-de-trigo-con-fusariosis-en-la-poscosecha.pdf>.
- Bennici, A. 1986. Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. 2: Crops. Disponible en [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-61625-9\\_5](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-61625-9_5).
- Berger, A., Díaz de Ackermann, M. y Castro, M. 2011. Predicción del momento de espigazón: una herramienta para planificar las siembras y diversificar el riesgo de ocurrencia de la fusariosis de la espiga. Revista INIA. 25: 16 - 19.

- Beyer, M., Verreeta, J-A. y Ragab, W. 2005. Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. *International Journal of Food Microbiology*. 98: 233-240.
- Bhat, R., Beedu, S., Ramakrishna, Y. y Munshi, K. 1989. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat products in Kashmir valley, India. *The Lancet*, 7: 35–37.
- Bhat, R., Shetty, P., Amruth, R. y Sudershan, R.L. 1997. A taining Fumonisin mycotoxins. *Clinical Toxicology*. 35(3): 249-255.
- Bhat, R. y Vasanthi, S. 2003. Mycotoxin food safety risk in developing countries. In: Unnevehr LJ, editor. 2020 Focus 10: food safety in food security and food trade. Washington, D.C.:Intl. Food Policy Research Institute.
- Blaney, B.J. y Dodman, R.L. 2002. Production of zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol, and acetylated derivatives by Australian isolates of *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* in relation to source and culturing conditions. *Australian Journal of Agricultural Research*. 53: 1317-1326.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Bottalico, A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80: 85-103
- Bottalico, A. y Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 108:611–624.
- Bozzini, A. 1988. Origin, distribution, and production of durum wheat in the world. En: *Durum Wheat: Chemistry y Technology*. G. Fabriani and C. Lintas (eds.). American Association of Cereal Chemists: St. Paul, Minnesota. APS Press. pp. 1-16
- Brera, C. et al. 2013. Study of the influence of the milling process on the distribution of deoxynivalenol content from the caryopsis to cooked pasta. *Food Control*. 32: 309–312.
- Buell, C.B. y Weston, W.H. 1947. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. *American Journal of Botany*. 34: 555–561.



- Burgess, L.W., Nelson, P.E. y Toussoun T.A. 1982. Characterization, Geographic Distribution and Ecology of *Fusarium crookwellense* sp. Nov. Transactions of the British Mycological Society Journal. 79 (3) 497-505.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Backhouse, D., Benyon, F. y Levic, J. 1996. Biodiversity and population studies in *Fusarium*. Sydowia. 48 (1): 1-11.
- Bushnell, W.R. et al. 2003. Histology and physiology of *Fusarium* head blight. En Leonard, K.J. y Bushnell, W.R., (eds). *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul, Minnesota. APS Press, pp. 44-83.
- Caballero, V.J. y Abbate, P.E. 2013. Análisis del rendimiento en cultivares de trigo pan ante el retraso en las fechas de siembra. Agrobarrow. 53: 25-27.
- Cano-Sancho, G., Marín, S., Ramos, A. y Sanchis, V. 2014. Micotoxinas: Estudio de dieta total en Catalunya 2008-2009.
- Capote, N., Pastrana, A., Aguado, A. y Sánchez-Torres, P. 2012. Molecular tools for detection on plant pathogenic fungi and fungicide resistance. Plant Pathology, Dr. Christian Joseph Cumagun (ed.). ISBN: 978-953-51-0489-6. pp. 151-202.
- Cappellini, R.A. y Peterson, J.L. 1965. Macroconidium formation in submerged cultures by a nonsporulating strain of *Gibberella zeae*. Mycologia. 57: 962-966.
- Castañares, E., Wehrhahne, L. y Stenglein, S. 2012. *Fusarium pseudograminearum* associated with barley kernels in Argentina. Plant Disease. 96:763.
- Castañares, E., Dinolfo, M., Moreno, M., Berón, C. y Stenglein, S. 2013. *Fusarium cerealis* associated with barley seeds in Argentina. Journal of Phytopathology. 161: 586-589.
- Castañares, E., Albuquerque, D.R., Dinolfo, M.I., Fernandez Pinto, V., Patriarca, A. y Stenglein, S.A. 2014. Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. International Journal of Food Microbiology. 179: 57-63.
- Champeil, A., Doré, T. y Fourbet, J.F. 2004. Review — *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. pp. 1-67.
- Chandler, E.A., Simpson, D.R., Sthonsett, M.A. y Nicholson, P. 2003. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum* and *Fusarium cerealis*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 62:355-367.

- Chelkowski, J. 1998. Distribution of *Fusarium* Species and Their Mycotoxins in Cereal Grains. En Sinha, K.K. y Bathnagar, D. (eds). Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. Marcel Dekker Inc. New York, pp. 45–64.
- Clear, R.M., Patrick, S.K., Gaba, D., Roscoe, M., Turkington, T.K., Demeke, T., Pouleur, S., Couture, L., Ward, T.J. y O'Donnell K. 2006. Trichothecene and zearalenone production, in culture, by isolates of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada. Canadian Journal of Plant Pathology. 28: 131–136.
- Costa-Neto, K.P. 1947. Parasitas de plantas cultivadas no Rio Grande do Sul. Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio. Porto Alegre, Brasil.
- Dalcero, A., Torres, A.M., Etcheverry, M., Chulze, S.N. y Varsavsky, E. 1997. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. Food Additives and Contaminants. 14: 11-14.
- de Galich, M.T.V. 1996. Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects. Proceeding of Workshop Held at CIMMYT. El Batán, México.
- de Galich, M.T.V. 1997. Fusarium Head blight in Argentina. Pp. 19-28 en Dubin, H., Gilchrist, L., Reeves, J. y McNab, A. (eds). Fusarium Head Scab: Global status and future prospects. CIMMYT. México, D.F.
- de Galich, M.T.V. 2002. Fusariosis de la espiga de trigo. Cap. 11 en: Franchina, J.; Saavedra, A. y Segura, L. Trigo. Actualización 2002. INTA.
- de Nus, M., Rombouts, F. y Notermans, S. 1996. *Fusarium* Molds and their mycotoxins. Journal of Food Safety. 16: 15-58.
- Del Ponte, E.M., Spolti, P., Ward, T.J.; Gomes, L.G.; Nicolli, C.P., Kuhnem, P.R., Silva, C.N. y Tessmann, D.J. 2014. Regional and field-specific factors affect the composition of Fusarium head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. Phytopathology.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M. y McCormick, S.P. 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. Microbiological Reviews. 57: 595-604.
- Desjardins, A.E. et al. 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. Molecular Plant-Microbe Interactions. 9: 775-781.

- Desjardins, A.E. 2008. Natural Product Chemistry Meets Genetics: When Is a genotype a chemotype? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 7587–7592.
- Dexter, J.E., Marchylo, B.A., Clear, R.M. y Clarke, J.M. 1997. Effect of *Fusarium* head blight on semolina milling and pasta-making quality of durum wheat. *Cereal Chemistry*. 74(5): 519–525.
- Díaz de Ackermann, M. y Kohli, M.M. 1997. Research on *Fusarium* head blight of wheat in Uruguay. En: H.J. Dubin, L. Gilchrist, J. Reeves y A. McNab (eds.). *Fusarium head scab: global status and future prospects*. CIMMYT. Mexico, D.F.
- Dill-Macky, R. 1997. *Fusarium* head blight: Recent epidemics and research efforts in the upper midwest of United States. En: H.J. Dubin, L. Gilchrist, J. Reeves y A. McNab, eds. *Fusarium head scab: global status and future prospects*. CIMMYT. Mexico, D.F.
- Dupuy, J., Le Bars, P., Boudra, H. y Le Bars, J. 1993. Thermostability of Fumonisin B1, a Mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in Corn. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(9): 2864-2867.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. Disponible en <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018. Disponible en <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/2018>.
- Farnworth, E.R. y Trenholm, H.L. 1983. The metabolism of the mycotoxin zearalenone and its effects on the reproductive tracts of young male and female pigs. *Canadian Journal of Animal Science*. 63: 967-975.
- Fernández Pinto, V., Terminiello, L.A., Basilico, J.C. y Ritieni, A. 2008. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39: 157-162.
- Fisher, N.L., Burgess, L.W., Toussoun, T.A. y Nelson, P.E. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*. 72: 151-153.
- Foroud, N.A y Eudes, F. 2009. Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, 10, 147-173.

- Fotso, J., Leslie, J. y Smith, J. 2002. Production of Beauvericin, Moniliformin, Fusaproliferin, and Fumonisin B1, B2, and B3 by fifteen ex-type strains of *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(10): 5195-5197.
- Freeman, G.G. y Morrison, R.I. 1949. The Isolation and chemical properties of Trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* Link. *Biochemistry*. 44: 1-5.
- Geiser, D., Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T., Zhang, N., Kulda, G. y O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 473-479.
- Gelderblom, W., Thiel, P., Marasas, W. y van der Merwe, K. 1984. Natural Occurrence of Fusarin C, a mutagen produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (32): 1064-1067.
- Gelderblom, W., Marasas, W., Vleggaar, R., Thiel, P. y Cawood, M.E. 1992. *Mycopathologia* (117): 11-16.
- Gilbert, J. y Tekauz, A. 2000. Review: Recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 22:1, 1-8.
- Gilchrist, L. y Dubin, H.J. 2002. *Fusarium* head blight. En: Curtis, B.C., Rajaram, S. y Gómez, H. Bread Wheat improvement and production. FAO Plant Production and Protection Series. ISBN 92-5-104809-6.
- González, H.H.L., Moltó, G.A., Pacin, A., Resnik, S.L., Zelaya, M.J., Masana, M. y Martínez, E. J. 2008. Trichothecenes and mycoflora in wheat harvested in nine locations in Buenos Aires province, Argentina. *Mycopathologia*, 165: 105-114.
- Gordon, W.L., 1944. Species of *Fusarium* isolated from farm samples of cereal seed in Manitoba. *Canadian Journal of Botany*. 22. En: *Canadian Journal of Plant Pathology*. 28: S111-S115 (2006).
- Gordon, W.L. 1952. Prevalence and taxonomy of *Fusarium* species in cereal seed. *Canadian Journal of Botany*. 30: 209-251.
- Gordon, W.L. 1954a. Taxonomy of *Fusarium* species in the seed of vegetable, forage, and miscellaneous crops. *Canadian Journal of Botany*. 32: 576-590.
- Gordon, W.L. 1954b. Taxonomy and prevalence of *Fusarium* species in the soil of cereal plots. *Canadian Journal of Botany*. 32: 622-629.

- Gordon, W.L. 1956a. Taxonomy and geographic distribution of *Fusarium* species in soil. Canadian Journal of Botany. 34: 833-846.
- Gordon, W.L. 1956b. The taxonomy and habitats of the *Fusarium* species in Trinidad, B.W.I. Canadian Journal of Botany. 34: 847-864.
- Gordon, W.L. 1959. The occurrence of *Fusarium* species in Canada: VI. Taxonomy and geographic distribution of *Fusarium* species on plants, insects, and fungi. Canadian Journal of Botany 37: 257-290.
- Gordon, W.L. 1960. The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperate regions. Canadian Journal of Botany. 38: 643-658.
- Goswami, R.S. y Kistler, H.C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular Plant Pathology, 5: 515–525.
- Gowayed, S. 2009. Egyptian Wheat. Doctoral dissertation submitted for the degree of Doctor of Agricultural Sciences of the Institute of Crop Sciences of the University Kassel. pp. 8-18.
- Grove, J.F. 1996. Non-macrocylic trichothecenes, part 2. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. 69:1-70
- Guarro, J., Pujol, I. y Mayayo, E. 1999. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. Antimicrob Agents Chemother 43(5):1256-1257.
- Hallas-Møller, M., Nielsen, K. y Frisvad, J. 2016. Production of the *Fusarium* Mycotoxin Moniliformin by *Penicillium melanoconidium*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. pp. 1-25.
- Hao, J-J., Xie, S-N., Sun, J., Yang, G-Q., Liu, J-Z., Xu, F., Ru, Y-Y. y Song, Y-L. 2016. Analysis of *Fusarium graminearum* species complex from wheat-maize rotation regions in Henan (China). Plant Disease. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0912-RE>.
- Hart, L.P., Pestka, J.J. y Liu, M.T. 1984. Effect of kernel development and wet periods on production of deoxynivalenol in wheat infected with *Gibberella zeae*. Postharvest Pathology and Mycotoxins. 74(12): 1415-1418.
- Hohn, T. y Vanmiddlesworth, F. 1986. Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthetase from *Fusarium sporotrichioides*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 251(2): 756-761.

- Hohn, T., Desjardins, A. y McCormick, S. 1995. The *tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Molecular General Genetics*. 248:95-102.
- Holguín, B. y Alvarado, A. 2017. “Comportamiento de la producción de harina de trigo en Ecuador”, *Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana*, Ecuador. Disponible en <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/ec/2017/produccionharinatrigo.html>.
- Iheshiulor, O.O.M., Esonu, B.O., Chuwuka, O.K., Omede, A.A., Okoli, I.C. y Ogbuewu, I.P. 2011. Effects of mycotoxins in animal nutrition: A review. *Asian Journal of Animal Sciences* 5(1): 19-33.
- Informe Institucional sobre la Calidad del Trigo Argentino, disponible en <http://www.trigoargentino.com.ar/2013/ESP/index.html>
- Informe especial sobre cultivos – Guía Estratégica para el Agro AÑO IV - N° 041 - 14/12/2012. Disponible en [http://www.bcr.com.ar/GEA%20 Archivos%20 Diarios/ Informes/Informe%20especial%20041%202012\\_12\\_14.pdf](http://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/Informes/Informe%20especial%20041%202012_12_14.pdf)
- International Agency for Research on Cancer. 1993. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone x. *IARC Monographs*. 56: 397-444.
- Ireta, J. y Gilchrist, L. 1994. *Fusarium* head scab of wheat (*Fusarium graminearum* Schwabe). Wheat special report N° 21b. CIMMYT. México D.F.
- Irvine, G.N. 1978. Durum wheat and paste products. p. 777-796. En: Pomeranz, Y. (ed.), *Wheat chemistry and technology*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.
- Jara, A. 2011. Caracterización y mercados del trigo candela. *Pregón Agropecuario*, Córdoba, Argentina. Disponible en: [www.pregonagropecuario.com/cat.php?txt=2135](http://www.pregonagropecuario.com/cat.php?txt=2135).
- Joffe, A.Z. 1974. A modern system of *Fusarium* taxonomy. *Mycopathologia et Mycologia applicata*. 53: 201-228.
- Jones, F.T., Genter, M.B., Hagler, W.M., Hansen, J.A., Mowrey, B.A., Poore, M.H. y Whitlow, L.W. 1994. Understanding and coping with effects of mycotoxins in livestock feed and forage. *North Carolina Cooperative Extension Service*. 1-14.
- Juárez, Z.N., Bárcenas-Pozos, M.E. y Hernández, L.R. 2014. El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 8(1): 79-93.

- Kan, C.A. y Meijer, G.A.L. 2007. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. 133: 84–108.
- Kendrick, B. 1992. *The fifth kingdom*. Focus Texts. Newburyport, USA.
- Kikot, G.E. et al. 2011. Occurrence of different species of *Fusarium* from wheat in relation to disease levels predicted by a weather-based model in Argentina pampas region. *Mycopathologia*. 171: 139–149.
- Kikot, G.E. 2012. Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana en relación a la patogenicidad. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10915/18266>.
- Kohli, M.M., Annone, J.G. y de Galich, M.T.V. 1995. Fusariosis de la espiga y su manejo. En: Kohli, M.M., Annone, J.G. y Garcia, R. (eds.) *Las enfermedades del trigo en el Cono Sur*. Curso de manejo de enfermedades de trigo. Centro Internacional de Capacitación INTA-CIMMYT, Pergamino, Buenos Aires, Argentina. pp. 164-189.
- Larsen, A. y Jensen, C. 2013. Evaluación regional de trigo candeal Campaña 2012/13. Serie: Informes Técnicos. Actualización técnica en cultivos de cosecha fina 2012/13. 1(1): 38-44.
- Lee, T., Oh, D-W., Kim, H-S., Lee, J., Kim, Y-H., Yun, S-H. y Lee, Y-W. 2001. Identification of Deoxynivalenol- and Nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7): 2966-2972.
- Lee, T., Han, Y-K., Kim, K-Y., Yun, S-H. y Lee, Y-W. 2002. Tri13 and Tri7 Determine Deoxynivalenol- and Nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(5): 2148-2154.
- Leslie, J.F. y Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. First. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Lew, H., Chelkowski, J., Pronczuk, P. y Edinger, W. 1996. Occurrence of the mycotoxin moniliformin in maize (*Zea mays* L.) ears infected by *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson et al. *Food additives and contaminants*. 13(3): 321-324.
- Lezcano, E. 2009. Pastas alimenticias. *Revista Alimentos Argentinos*. N° 46. pp. 20-28.
- Lezcano, E. 2013. FARINÁCEOS. Informe Sectorial de las Cadenas Agroalimentarias N° 14.

- Lezcano, E. 2014. FARINÁCEOS. Informe Sectorial de las Cadenas Agroalimentarias N° 15.
- Li, H-P., Wu, A-B., Zhao, C-S., Scholten, O., Löffler, H. y Liao, Y-C. 2005. Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. FEMS Microbiology Letters. 243: 505–511.
- Lionetti, V., Giancaspro, A., Fabri, E., Giove, S., Reem, N., Zabolina, O., Blanco, A., Gadaleta, A. y Bellincampi, D. 2015. Cell wall traits as potential resources to improve resistance of durum wheat against *Fusarium graminearum*. BMC Plant Biology. 15:6. DOI 10.1186/s12870-014-0369-1.
- Liu, Z.Z. 1985. Recent Advances in Research on Wheat Scab in China. en Villareal, R.L. Wheats for more tropical environments. A proceedings of the International Symposium. CIMMYT. pp. 174-181.
- Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., González-Jaén, M.T., Valle-Algarra, F.M., Logrieco, A. y Jiménez, M. 2006. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). International Journal of Food Microbiology. 106: 297-306.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J. y Jiménez, M. 2004. Influence of environmental factors on the biosynthesis of the type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. International Journal of Food Microbiology. 94: 43-54.
- Lori, G.A., Carranza, M.R., Violante, A., Rizzo, I. y Alippi, H.E. 1992: *Fusarium* spp, en trigo, capacidad toxicogénica y quimiotaxonomía de las cepas aisladas en la Argentina. Agronomie. 12: 459-467.
- Lori, G.A., y Sisterna, M.N. 2001. Occurrence and distribution of *Fusarium* spp. associated with durum wheat seed from Argentina. Journal of Plant Pathology. 83: 63-67.
- Lori, G.A., Sisterna, M.N., Haidukowski, M. y Rizzo, I. 2003. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. Microbiological Research. 158: 29-35.
- Lori, G.A. y Rizzo I. 2007. Deoxinivalenol. pp. 396–421 en Soriano del Castillo, J.M. (ed.) Micotoxinas en alimentos. Ediciones Díaz de Santos, Valencia, España.
- Lori, G.A., Sisterna, M.N., Sarandón, S.J., Rizzo, I. y Chidichimo, H. 2009. *Fusarium* head blight in wheat: impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. Crop Protection. 28: 495-502.



- Luo, X.Y. 1988. *Fusarium* toxin contamination in China. Proc. Japan Assoc. Mycotoxicology Supplement. 1: 97-98.
- Lu, W.H., Chen, S.H. y Wang, Y.Z. 2001. Research on *Fusarium* Head scab, Science Publisher, Beijing.
- Luongo, D., De Luna, R., Russo, R. y Severino, L. 2008. Effects of four *Fusarium* toxins (fumonisin B1,  $\alpha$ -zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. *Toxicon*. 52: 156-162.
- Malbrán, I., Mourellos, C.A., Girotti, J.R., Aulicino, M.B., Balatti, P.A., y Lori, G.A.. 2012. Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. *Crop Protection*. 42: 234-24
- Malbrán, I. 2013. Agresividad, producción de micotoxinas y diversidad en las poblaciones de *Fusarium graminearum* de la región triguera argentina. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias.
- Malbrán, I. C.A. Mourellos, J.R. Girotti, P.A. Balatti, y G.A. Lori. 2014. Toxigenic capacity and trichothecene production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentina and their relationship with aggressiveness and fungal expansion in the wheat spike. *Phytopathology*. 104: 357-364.
- Martin, R.A. y Johnston, H.W. 1982. Effects and control of *Fusarium* diseases of cereal grains in the Atlantic Provinces, *Canadian Journal of Plant Pathology*. 4(2): 210-216.
- Martínez-de la Parte, E., Pérez-Vicente, L. y Dita, M. 2014. Protocols for molecular identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.
- Matsumoto, G., Wuchiyama, J., Shingu, Y., Kimura, M., Yoneyama, K. y Yamaguchi, I. 1999. The trichothecene biosynthesis regulatory gene from the type B producer *Fusarium* strains: sequence of Tri6 and its expression in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 63(11): 2001-2004.
- McCormick, S.P., Hohn, T.M. y Desjardins, A.E. 1996. Isolation and characterization of Tri3, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 353–359.
- McCormick, S.P., Alexander, N.J., Trapp, S.E. y Hohn, T.M. 1999. Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-Acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(12): 5252–5256.

- McCormick, S.P. 2003. The role of DON in pathogenicity. pp. 165–183 en Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. (eds.) *Fusarium head blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- McMullen, M., Jones, R. y Gallemberg, D. 1997. Scab of wheat and barley: re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81: 1340-1348.
- McMullen, M., Bergstrom, G., Dill-Macky, R. y Shaner, G. 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium head blight*. *Plant Disease* / Vol. 96 No. 12. 1712-1728.
- Mihuta-Grimm, L. y Foster, R. 1989. Scab of wheat and barley in Southern Idaho and evaluation of seed treatments for eradication of *Fusarium* spp. *Plant Disease*. 73(9): 769-771.
- Miller, J.D., Culley, J., Fraser, K., Hubbard, S., Meloche, F., Ouellet, T., Seaman, L., Seifert, K., Turkington, K. y Voldeng, H., 1998. Effect of tillage on *Fusarium head blight of wheat*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20: 95-103.
- Miller, J.D., Apsimon, J.W., Blackwell, B.A., Greenhalgh, R. y Taylor, A. 2001. Deoxynivalenol: a 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance. En: Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L. y Burgess, L.W. (eds.) *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp. 310–320.
- Minervini, F., Fornelli, F. y Flynn, K. 2004. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro*. 18: 21–28.
- Mirocha, C.J., Xie, W. y Filho, E.R. 2003. Chemistry and detection of *Fusarium* mycotoxins. En Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. (eds.) *Fusarium head blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp. 144-183
- Molfese, E.R. y Seghezzo, M.L. 2012. Obtención de variedades de trigo candeal con alta calidad industrial. Chacra Experimental Integrada Barrow (convenio MAA-INTA) PE AETA 282821.
- Moretti, A., Logrieco, A., Bottalico, A., Ritieni, A., Randazzo, G. y Corda, P. 2009. Beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from different geographical areas. *Mycological Research*. 99(3): 282-286.
- Monds, R., Cromey, M., Lauren, D., di Menna, M. y Marshall, J. 2005. *Fusarium graminearum*, *F. cortaderiae* and *F. pseudograminearum* in New Zealand: molecular

- phylogenetic analysis, mycotoxin chemotypes and co-existence of species. *Mycological Research*. 109(4): 410–420.
- Moschini, R.C. y Fortugno, C. 1996. Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 211–218.
- Moschini, R.C., Pioli, R., Carmona, M. y Sacchi, O. 2001. Empirical predictions of wheat head blight in the northern Argentinean Pampas region. *Crop Science*. 41: 1541-1545.
- Moss, M.O. y Thrane, U. 2004. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters*. 153: 23-28.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *ColdSpring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51: 263-273.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania, USA.
- Nelson, P.E. 1991. History of *Fusarium* systematics. *Phytopathology*. 81: 1045-1048.
- Nelson, P.E., Dignani, M. y Anaissie, E. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical microbiology reviews*. 7(4): 479-504.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W. y Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 53: 17-37.
- Nowicki, T.W., Gaba, D.G., Dexter, J.E., Matsuo, R.R. y Clear, R.M. 1998. Retention of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in wheat during processing and cooking of spaghetti and noodles. *Journal of Cereal Science*. 8: 189-202.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C. y Aoki, T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 600–623.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H., Aoki, T. y Cigelnik, E. 2000. A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 41: 61-78.

- Osborne, L.E. y Stein, J.M. 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*. 119: 103-108.
- Palacios, S.A., Gaj Merlera, G., Erazo, J., Reynoso, M.M., Farnochi M.C y Torres A.M. 2017. Trichothecene genotype and genetic variability of *Fusarium graminearum* and *F. cerealis* isolated from durum wheat in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*. DOI 10.1007/s10658-017-1247-0.
- Palumbo, M., Spina, A. y Boggini, G. 2000. "Agronomic and breadmaking characteristics of durum wheat genotypes deriving from interspecific hybridisation with bread wheat," en *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges*, J. L. Araus, N. Di Fonzo, M. Nachit, and C. Royo (eds.), pp. 515-518.
- Parry, D.W., Jenkinson, P. y McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology*. 44: 207-238.
- Peraica, M. y Domijan, A-M. 2001. Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arhiv Rada Toksikol*, 52: 23-35.
- Peralta, C. y Degrossi, M. 2004. Moniliformin, a *Fusarium* mycotoxin. *Revista mexicana de micología*. 19: 103-112.
- Petersen, A. y Thorup, I. 2001. Preliminary evaluation of fumonisins by the Nordic countries and occurrence of fumonisins (FB1 and FB2) in corn-based foods on the Danish market. *Food Additives and Contaminants*. 18(3): 221-226.
- Pitt, J. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 56(1):184-192.
- Prelusky, D., Miller, J. y Trenholm, H. 1996. Disposition of <sup>14</sup>C - derived residues in tissues of pigs fed radio labelled fumonisin B1. *Food Additives and Contaminants*. 13(2):155-162.
- Proctor, R.H., Hohn, M.T. y McCormick, S.P. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8: 593-601.
- Proctor, R.H., Hohn, M.T. y McCormick, S.P. 1997. Restoration of wild type virulence of Tri5 disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. *Microbiology*. 143: 2583-2591.
- Quarta, A., Mita, G., Haidukowski, M., Santino, A., Mulè, G. y Visconti, A. 2005. Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Food additives and contaminants*. 22:309-315.

- Quarta, A., Mita, G., Haidukowski, M., Logrieco, A., Mulè, G. y Visconti, A. 2006. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. FEMS Microbiology Letters. 259:7-13.
- Ramakrishna, Y., Bhat, R.V. y Ravindranath, V. 1989. Production of deoxynivalenol by *Fusarium* isolates from samples of wheat associated with a human mycotoxicosis outbreak and from sorghum cultivars. Applied and Environmental Microbiology. 55:2619-20.
- Ramírez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C. y Chulze, S. 2006. Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. European Journal of Plant Pathology. 115: 139-148.
- Ramírez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C., Torres, A.M., Leslie, J.F. y Chulze, S.N. 2007. Population structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. Food Additives and Contaminants. 24: 1115-1120.
- Reece, R.J. 2004. Analysis of genes and genomes. John Wiley & Sons Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, Inglaterra.
- Refai, M., Hassan, A. y Hamed, M. 2015. Monograph on the genus *Fusarium*. Disponible en [scholar.cu.edu.eg/monograph.pdf](http://scholar.cu.edu.eg/monograph.pdf).
- Reynoso, M.M., Ramírez, M.L., Torres, A.M. y Chulze, S.N. 2011. Trichothecenegenotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. International Journal of Food Microbiology. 145: 444-448.
- Richard, J. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview. International Journal of Food Microbiology. 119:3-10.
- Rizzo, I., Lori, G., Vedoya, G., Carranza, M., Haidukowski, M., Varsavsky, E., Frade, H., Chiale, C. y Alippi, H. 1997. Sanitary factors and mycotoxin contamination in the argentinian wheat crop 1993/94. Mycotoxin Research. 13: 67-72.
- Rojas, L., Wilches, A. y Darghan, E. 2015. Co-ocurrencia de microorganismos y sus metabolitos tóxicos en productos alimenticios infantiles. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica. 18 (1):3-12.
- Ross, P.F., Nelson, P.E., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Rice, L.G., Plattner, R.D. y Wilson, T.M., 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a

- pulmonary edema syndrome in swine. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 3225.
- Rubianes, J. 2007. Prolaminas y marcadores moleculares relacionados con la calidad en Trigo Duro (*Triticum turgidum* L.). Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/11991059.pdf>.
- Saari, E.E y Wilcoxson, R.D. 1974. Plant disease situation of high-yielding dwarf wheats in Asia and Africa. *Annual Review of Phytopathology*. 12:49-68.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. y Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230:1350-1354.
- Sainz, M.J., Aguin, O., Ferreiroa, V., Bande, M.J. y Mansilla J.P. 2015. Incidencia y diversidad de especies de fusarium en granos, tallos y hojas de híbridos de maíz forrajero en Galicia. En: 54ª Reunión Científica de la SEEP (14-17 abril 2015). Disponible en <http://ciam.gal/uploads/publicacions/1130archivo.pdf>.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sampietro, D.A., Marín, P., Iglesias, J., Presello, D.A., Vattuone, M.A., Catalan, C.A.N. y GonzalezJaen, M.T. 2010. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biology*. 114: 74-81.
- Schmale, D.G. y Bergstrom, G. 2003. Fusarium head blight in wheat. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2003-0612-01.
- Schroeder, H.W. y Christensen, J.J. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*. 53: 831-838.
- Seghezzo, M.L. y Molfese, E.R. 1999. Trigo candeal. Criterios para la evaluación de calidad. Chacra Experimental Integrada Barrow. Publicación Miscelánea N° 2. ISSN 0327-8735.
- Seghezzo, M.L. 2014. Calidad en trigo candeal. Ediciones INTA, Primera Edición. ISBN 978-987-521-615-0. Tres Arroyos, Buenos Aires.
- Seguimiento semanal de cultivos Zona Núcleo – Guía Estratégica para el Agro AÑO VI - N° 282–29/11/2012. Disponible en [http://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/ Informes/GEA%20282\\_2012\\_29\\_11.pdf](http://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/ Informes/GEA%20282_2012_29_11.pdf)

- Snijders, C.H.A. 1990. *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 96:187-198.
- Snijders, C.H.A. 1989. Current status of breeding wheat for *Fusarium* head blight resistance and the mycotoxin problem in the Netherlands. Workshop on *Fusarium* head blight and related mycotoxins. CIMMYT. Cd Obregón. Sonora. México. pp. 17-20.
- Snyder, W.C. y Hansen, H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*. 27: 64-67.
- Snyder, W.C. y Hansen, H.N. 1941. The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. *American Journal of Botany*. 28: 738-742.
- Snyder, W.C. y Hansen, H.N. 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to *discolor* and other sections. *American Journal of Botany*. 32: 657-666.
- Snyder, W.C. y Hansen, H.N. 1954. Variation and speciation in the genus *Fusarium*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 60: 16-23.
- Sotomayor, I. 2012. La raza tropical 4 del mal de Panamá: Amenaza potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador. Boletín Divulgativo no. 418. INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Programa Nacional de Banano, Plátano y otras Musáceas. Quevedo, Ecuador. Disponible en <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3373>.
- Stack, R.W, 2000. Return of an Old Problem: fusarium head blight of small grains plant health progress - Plant Health Reviews. Disponible en: <http://www.Plantmanagementnetwork.org/php/elements/sum2.aspx?id=73>.
- Stack, R.W. 2003. History of *Fusarium* head blight with emphasis in North America. pp. 1–34. En Leonard, K.J., Bushnell, W.R. (eds.), *Fusarium* head blight of wheat and barley. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, H.C., Geiser, D.M., Suga, H., Tóth, B., Varga, J. y O'Donnell, K. 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal genetics and biology*. 44: 1191-1204.
- Sudakin, D. 2003. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters*. 143:97-107.

- Sugiura, Y., Fukasaku, K., Tanaka, T., Matsui, Y. y Ueno, Y. 1993. *Fusarium poae* and *Fusarium crookwellense*, fungi responsible for the natural occurrence of Nivalenol in Hokkaido. Applied and Environmental Microbiology. 59(10):3334-3338.
- Sutton, J.C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology. 4: 195–209
- Taylor, J.W. y Fisher, M.C. 2003. Fungal multilocus sequence typing – it's not just for bacteria. Current Opinion in Microbiology 6: 351-356.
- Thrane, U. 1989. *Fusarium* species and their specific profiles of secondary metabolites. En Chelkowski J (ed.) *Fusarium* - mycotoxins, taxonomy, and pathogenicity. pp. 199-225.
- Trail, F., Mahanti, N. y Linz, J. 1995. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. Microbiology (Reading, U.K.) 141:755-765.
- Trail, F. 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. Plant Physiology. 149: 103-110.
- Trigo-Stockli, D., Sánchez-Mariñez, R., Cortez-Rocha, M. y Pedersen, J. 1998. Comparison of the Distribution and Occurrence of *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol in Hard Red Winter Wheat for 1993-1996. Cereal Chemistry. 75(6):841-846.
- Tschanz, A., Horst, R. y Nelson, P. 1976. The Effect of Environment on Sexual Reproduction of *Gibberella zeae*. Mycologia. 68(2): 327-340.
- Tunali, B., Obanor, F., Erginbas, G., Westecott, R., Nicol, J. y Chakraborty, S. 2012. Fitness of three *Fusarium* pathogens of wheat. FEMS Microbiology Ecology. pp. 1-14.
- van Dongen, P y de Groot, A. 1995. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 60:109-116.
- Vasanthi, S. y Bhat, R. 1998, Mycotoxins in foods - Occurrence, health & economic significance & food control measures. Indian Journal of Medical Research. 108: 212-224.
- Viedma, L. 1989. Importancia y distribución de la fusariosis de trigo en Paraguay. En: M.M. Kohli, ed. Taller sobre la Fusariosis de la espiga en América del Sur. CIMMYT. Mexico, D.F.



- Visconti, A., Haidukowski, E., Pascale, M. y Silvestri, M. 2004. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicology Letters*. 153:181-189.
- Wang, H., Hwang, S.F., Eudes, F., Chang, K.F., Howard, R.J. y Turnbull, G.D. 2006. Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seedling blight and root rot in cereals. *Plant Pathology*. 55: 224-230.
- Wang J-H., Li, H-P., Qu, B., Zhang, J-B., Huang, T., Chen, F-F y Liao, Y-C. 2008. Development of a Generic PCR Detection of 3-Acetyldeoxynivalenol-, 15-Acetyldeoxynivalenol- and Nivalenol-Chemotypes of *Fusarium graminearum* Clade. *International Journal of Molecular Sciences*. 9:2495-2504.
- Ward, T.J. Bielawski, J.P., Kistler, H.C., Sullivan, E. y O'Donnell, K. 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 9278-9283.
- Wickens, G.E. 2001. *Economic Botany. Principles and Practices*. Springer Science and Business Media, New York, USA. p. 28.
- Windels, C. 1991. Current Status of *Fusarium* Taxonomy. *Phytopathology*. 81(9):1048-1051.
- Yiannikouris, A. y Jonuany, J-P. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*. 51: 81-99.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Aoki, T., Kistler, H.C. y O'Donnell, K. 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*. 101: 841-852.
- Yli-Mattila, T. y Gagkaeva, T. 2010. Molecular chemotyping of *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis* isolates from Finland and Russia. *Completar*
- Yli-Mattila, T. 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*. 92 (1): 7-18.
- Yoder, W.T. y Christianson, L.M. 1998. Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*: Taxonomic status of the edible "Quorn" fungus reevaluated. *Fungal Genetics and Biology*. 23: 68-80.

Zain, M.E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society. 15: 129-144.

Zaki M.M., El-Midany, S.A., Shaheen, H.M. y Rizzi, L. 2012. Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences, 4(1): 13-28.